

特許協力条約に基づく国際出願  
国際予備審査請求書

## 第 II 章

出願人は、次の国際出願が特許協力条約に従って国際予備審査の対象とされることを請求し、  
選択資格のある全ての国を選択する。ただし、特段の表示がある場合を除く。

## 国際予備審査機関記入欄

国際予備審査機関の確認	請求書の受理の日
-------------	----------

第 I 欄 国際出願の表示		出願人又は代理人の書類記号 2633WO0P
国際出願番号 PCT/JP00/05684	国際出願日 (日. 月. 年) 24.08.00	優先日 (最先のもの) (日. 月. 年) 27.08.99

発明の名称

新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質およびそのDNA

## II 欄 出願人

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)  武田薬品工業株式会社 TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. 〒541-0045 日本国大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi, OSAKA 541-0045 JAPAN	電話番号:  ファクシミリ番号:  加入電話番号:
国籍 (国名): 日本国 Japan	住所 (国名): 日本国 Japan

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)  渡辺卓也 WATANABE Takuya 〒532-0033 日本国大阪府大阪市淀川区新高6丁目14番9-B904号 14-9-B904, Niitaka 6-chome, Yodogawa-ku, Osaka-shi, OSAKA 532-0033 JAPAN	
国籍 (国名): 日本国 Japan	住所 (国名): 日本国 Japan

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)  菊地久仁子 KIKUCHI Kuniko 〒302-0024 日本国茨城県取手市新町5丁目8-18-101号 8-18-101, Shinmachi 5-chome, Toride-shi, IBARAKI 302-0024 JAPAN	
国籍 (国名): 日本国 Japan	住所 (国名): 日本国 Japan

☒ その他の出願人が続葉に記載されている。



第 II 欄の続き 出願人

この第 II 欄の続きを使用しない時は、この用紙を国際予備審査請求書に含めないこと。

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

新谷靖 SHINTANI Yasushi  
〒305-0821 日本国茨城県つくば市春日1丁目7番地9-703号  
7-9-703, Kasuga 1-chome, Tsukuba-shi, IBARAKI 305-0821 JAPAN

国籍 (国名): 日本国 Japan

住所 (国名): 日本国 Japan

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

国籍 (国名):

住所 (国名):

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

国籍 (国名):

住所 (国名):

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

国籍 (国名):

住所 (国名):

☐ その他の出願人が他の続葉に記載されている。





### 第Ⅲ欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名

下記に記載された者は、☒ 代理人 又は ☐ 共通の代表者 として

☒ 既に選任された者であつて、国際予備審査についても出願人を代理する者である。

☐ 今回新たに選任された者である。先に選任されていた代理人又は共通の代表者は解任された。

☐ 既に選任された代理人又は共通の代表者に加えて、特に国際予備審査機関に対する手続きのために、今回新たに選任された者である。

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

電話番号：

11404 弁理士 高橋 秀一 TAKAHASHI Shuichi

03-3278-2235

11045 弁理士 内山 務 UCHIYAMA Tsutomu

ファクシミリ番号：

03-3278-2222

〒532-0024 日本国大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号  
武田薬品工業株式会社大阪工場内  
c/o Osaka Plant of Takeda Chemical Industries, Ltd.  
17-85, Jusohonmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka-shi, OSAKA  
532-0024 JAPAN

加入電信番号：

☐ 通知のためのあて名：代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す

### 第Ⅳ欄 国際予備審査に対する基本事項

補正に関する記述：\*

1. 出願人は、次のものを基礎として国際予備審査を開始することを希望する。

☒ 出願時の国際出願を基礎とすること。

☐ 明細書に関して

☐ 出願時のものを基礎とすること。

☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。

☐ 請求の範囲に関して

☐ 出願時のものを基礎とすること。

☐ 特許協力条約第19条の規定に基づいてなされた補正（添付した説明書も含む）を基礎とすること。

☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。

☐ 図面に関して

☐ 出願時のものを基礎とすること。

☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。

2 ☐ 出願人は、特許協力条約第19条の規定に基づく請求の範囲に関する補正を差し替えることによって考慮されることを望む。

3 ☐ 出願人は、国際予備審査の開始が優先日から20月経過まで延期されることを望む（ただし、国際予備審査機関が、特許協力条約第19条の規定に基づき行われた補正書の写しの受領、又は当該補正を希望しない旨の出願人からの通知を受領した場合を除く（規則69.1(d)）。  
（この口は、特許協力条約第19条の規定に基づく期間が満了していない場合にのみ、レ印を付すことができる。）

\* 記入がない場合は、1)補正がないか又は国際予備審査機関が補正（原本又は写し）を受領していないときは、出願時の国際出願を基礎に予備審査が開始され、2)国際予備審査機関が、見解書又は予備審査報告書の作成開始前に補正（原本又は写し）を受領したときは、これらの補正を考慮して予備審査が開始又は続行される。

国際予備審査を行うための言語は 日本語 であり、

☒ 国際出願提出時の言語である。

☐ 国際調査のために提出した翻訳文の言語である。

☐ 国際出願の公開の言語である。

☐ 国際予備審査の目的のために提出した翻訳文の言語である。

### 第Ⅴ欄 国の選択

出願人は、選択資格のある全ての指定国（即ち、既に出願人によって指定されており、かつ特許協力条約第Ⅱ章に拘束されている国）を選択する。

ただし 出願人は次の国の選択を希望しない：



第VI欄 照合欄

この国際予備審査請求書には、国際予備審査のために、第IVに記載する言語による書類が添付されている。

国際予備審査機関記入欄

- |  |   |
|--|---|
| 1. 国際出願の翻訳文 .....                                    | 枚 |
| 2. 特許協力条約第34条の規定に基づく補正書 .....                        | 枚 |
| 3. 特許協力条約第19条の規定に基づく補正書<br>(又は、要求された場合は翻訳文)の写し ..... | 枚 |
| 4. 特許協力条約第19条の規定に基づく説明書<br>(又は、要求された場合は翻訳文)の写し ..... | 枚 |
| 5. 書簡 .....  | 枚 |
| 6. その他(書類名を具体的に記載する)                                 | 枚 |

受領 未受領

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

この国際予備審査請求書には、さらに下記の書類が添付されている。

- |   |   |
|---|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> 手数料計算用紙                 | 3. <input type="checkbox"/> 包括委任状の写し                        |
| <input checked="" type="checkbox"/> 納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面 | 4. <input type="checkbox"/> 記名押印(署名)に関する説明書                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> 国際事務局の口座への振込を証明する書面     | 5. <input type="checkbox"/> スクレオチド又はアミノ酸配列表<br>(フレキシブルディスク) |
| 2 <input type="checkbox"/> 別個の記名押印された委任状                    | 6. <input type="checkbox"/> その他(書類名を具体的に記載する):              |

第VII欄 提出者の記名押印

各人の氏名(名称)記載し、その次に押印する。

高橋 秀一



内山 務



国際予備審査機関記入欄

- 国際予備審査請求書の実際の受理の日
- 規則60.1(b)の規定による国際予備審査請求書の受理の日の訂正後の日付
- ☐ 優先日から19月を経過後の国際予備審査請求書の受理。ただし、以下の4、5の項目にはあてはまらない。 ☐ 出願人に通知した。
- ☐ 規則80.5により延長が認められている優先日から19月の期間内の国際予備審査請求書の受理
- ☐ 優先日から19月を経過後の国際予備審査請求書の受理であるが規則82により認められる。

国際事務局記入欄

国際予備審査請求書の国際予備審査機関からの受領の日:



1

## P C T

## 手 数 料 計 算 用 紙

国際予備審査請求書の附属書

国際出願番号  PCT/JP00/05684	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">         国際予備審査機関記入欄       </div>
出願人又は代理人の書類記号  2633WO0P	国際予備審査機関の日付印

出願人  武田薬品工業株式会社									
<div style="border: 1px solid black; padding: 10px;"> <p>所定の手数料の計算</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 40%; padding: 5px;">           1. 特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律(国内法)            第18条第1項第4号の規定による手数料            (予備審査請求料) (注1)         </td> <td style="width: 60%; text-align: right; padding: 5px;"> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 5px 20px;">28,000 円</div> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 5px 5px; margin-left: 5px;">P</div> </td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">           2. 取扱手数料 (注2) .....         </td> <td style="text-align: right; padding: 5px;"> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 5px 20px;">14,600 円</div> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 5px 5px; margin-left: 5px;">H</div> </td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">           3. 所定の手数料の合計             P及びHに記入した金額を加算し、合計額を合計に記入...         </td> <td style="text-align: right; padding: 5px;"> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 5px 20px;">42,600 円</div> </td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="text-align: right; padding: 5px;"> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 5px 20px;">合 計</div> </td> </tr> </table> </div>		1. 特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律(国内法) 第18条第1項第4号の規定による手数料 (予備審査請求料) (注1)	<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 5px 20px;">28,000 円</div> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 5px 5px; margin-left: 5px;">P</div>	2. 取扱手数料 (注2) .....	<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 5px 20px;">14,600 円</div> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 5px 5px; margin-left: 5px;">H</div>	3. 所定の手数料の合計  P及びHに記入した金額を加算し、合計額を合計に記入...	<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 5px 20px;">42,600 円</div>	<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 5px 20px;">合 計</div>	
1. 特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律(国内法) 第18条第1項第4号の規定による手数料 (予備審査請求料) (注1)	<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 5px 20px;">28,000 円</div> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 5px 5px; margin-left: 5px;">P</div>								
2. 取扱手数料 (注2) .....	<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 5px 20px;">14,600 円</div> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 5px 5px; margin-left: 5px;">H</div>								
3. 所定の手数料の合計  P及びHに記入した金額を加算し、合計額を合計に記入...	<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 5px 20px;">42,600 円</div>								
<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 5px 20px;">合 計</div>									

(注1) 法第18条第1項第4号の規定による手数料については、特許印紙をもって納付しなければならない。

(注2) 取扱手数料については、国際予備審査機関である日本国特許庁の長官が告示する国際事務局の口座への振り込みを証明する書面を提出することにより納付しなければならない。



## PCT

## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
(PCT18条、PCT規則43、44)

出願人又は代理人 の書類記号 2633WOOP	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/05684	国際出願日 (日.月.年) 24.08.00	優先日 (日.月.年) 27.08.99
出願人(氏名又は名称) 武田薬品工業株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

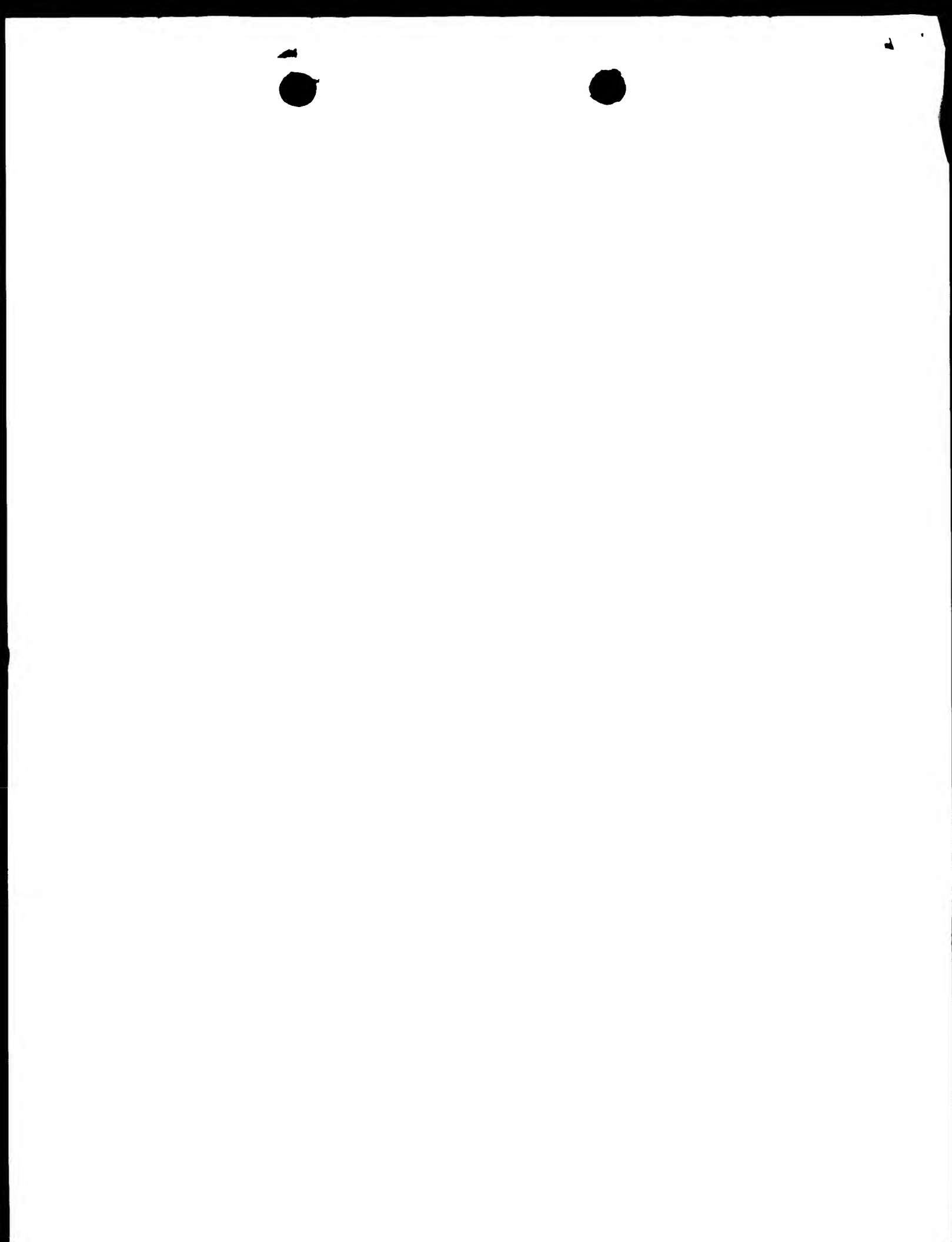
6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。





## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C12N15/09, C07K14/705, C07K16/28,  
C12P21/02, A61K45/00, A61P43/00, G01N33/566,  
G01N33/15, G01N33/50

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C12N15/09, C07K14/705, C07K16/28,  
C12P21/02, A61K45/00, A61P43/00, G01N33/566,  
G01N33/15, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	WO, 00/11015, A1 (ALPHAGENE, INC) 2. 3月. 2000 (02. 03. 00) &AU, 9957847, A	1 - 14
P, X	WO, 00/22131, A2 (BEHAN, Dominic, P. et al) 20. 4月. 2000 (20. 04. 00) &AU, 9962991, A	1 - 14

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12. 12. 00

国際調査報告の発送日

19.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

六笠 紀子

4 B

9735

電話番号 03-3581-1101 内線 3448



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	LIBERT, F. et al. "Selective amplification and cloning of four new members of the G protein-coupled receptor family", Science (1989)第244巻, 第4904号, p. 569-572	1 - 1 4
Y	NOTHACKER, H. P. et al. "Molecular cloning of a novel, putative G protein-coupled receptor from sea anemones structurally related to members of the FSH, TSH, LH/CG receptor family from mammals", BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. (1993)第197巻, 第3号, p. 1062-1069	1 - 1 4
Y	EP, 877083, A (SMITHKLINE BEECHAM CORP.) 11. 11月. 1998 (11. 11. 98) & JP, 11-75870, A	1 - 1 4
Y	WO, 97/24436, A2 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) 10. 7月. 1997 (10. 07. 97) & AU, 1208497, A & JP, 10-146192, A & EP, 870020, A & CN, 1207126, A	1 - 1 4



## 特許協力条約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

担当者	G・M	Pat・M	
			P

出願人代理人

高橋 秀一

殿

あて名

〒532-0024

大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85

武田薬品工業株式会社知的財産部

PCT/JPO0/05684

PE402

国際予備審査請求書  
の受理通知書

（法施行規則第54条第1項）

〔PCT規則59.3(e)及び61.1(b)第1文、  
実施細則601(a)〕

発送日（日・月・年）

10.10.00

出願人又は代理人

の書類記号

2633WOOP

重要な通知

国際出願番号

PCT/JPO0/05684

国際出願日（日・月・年）

24.08.00

優先日（日・月・年）

27.08.99

出願人（氏名又は名称）

武田薬品工業株式会社

1. 国際予備審査機関は、国際出願の国際予備審査請求書を次の日に受理したことを通知する。

29日09月00年

2. この受理の日は次に示す日である。

- ☒ 管轄する国際予備審査機関が国際予備審査請求書を受理した日  
（PCT規則61.1(b)）
- ☐ 管轄する国際予備審査機関に代わって国際予備審査請求書を受理した日  
（PCT規則59.3(e)）
- ☐ 国際予備審査請求書の手続き補完書を管轄する国際予備審査機関が受理した日

3. ☐ 受理の日は、優先日から19箇月が経過している。

（注意） 国際予備審査請求書に記載した選択国の国内段階開始時期の優先日から30箇月まで（遅い官庁がある）の効果はない。（PCT第39条（1））したがって、国内段階移行の手続きは、優先日から20箇月以内（遅い官庁がある）に行わなければならない。（PCT第22条）

詳細については、PCT出願人の手引き・第II巻」を参照すること。

☐ この内容は、口頭又は電話により次の日に行った連絡を確認するためのものである。

4. 上記の3に該当する場合に、この通知書の写しは国際事務局に送付した。

名称及びあて名

日本国特許庁（IPEA/JP）

郵便番号 100-8915 TEL 03-3592-1308

日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

様式PCT/IPEA/402（1998年7月）

権限のある職員

特許庁長官



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US99/19351

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(6) : C07H 21/04; C07K 14/705; C12N 15/09; 15/63; C12Q 1/68

US CL : 536/23.1, 24.3; 435/7.2. 69.1, 320.1; 530/350, 300

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 536/23.1, 24.3; 435/7.2. 69.1, 320.1; 530/350, 300

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE, JAPIO, BIOSIS, WPIDS, CAPLUS, EMBASE, N-GENESEQ35, N-ISSUED, EMBL-EST58, PIR60, SWISS-PROT37, SPTREMBL19, EMBL58

search terms: secreted proteins, 98862, 98846, VB11

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Database EMBASE EST-58 , Accession No. AA458581, NID g2183488, HILLIER et al., 'aa12e01.rl Soares-NhHMPu-S1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:813048 5' similar to contains element PTR5 repetitive element; mRNA sequence, 9 June, 1997	1-11
0		
X	Database EMBASE EST 158, Accession No. Z99943, NID g2887308, PEARCE, A., 'Human DNA sequence from PAC 313L4 on chromosome 1q24. Contains ESTs.' 12 February 1998	44-45

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
*B* earlier document published on or after the international filing date	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*A* document member of the same patent family
*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search

16 NOVEMBER 1999

Date of mailing of the international search report

11 JAN 2000

Name and mailing address of the ISA/US  
Commissioner of Patents and Trademarks  
Box PCT  
Washington, D.C. 20231

Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer

NIRMAL S. DAS

Telephone No. (703) 308-0196





# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US99/19351

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Please See Extra Sheet.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:  
1-11 and 44-45
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US99/19351

### BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION WAS LACKING

This ISA found multiple inventions as follows:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I, claim(s)1-11, drawn to polynucleotide comprising SEQ ID NO:1, fragments thereof, expression vector containing said sequence, cell transformed with said vector, polypeptide of SEQ ID NO:2, fragments of the polypeptide of SEQ ID NO:2 and process for preparing said polypeptide.

Group II, claim(s)12-13, drawn to polynucleotide comprising SEQ ID NO:3, fragments thereof, polypeptide of SEQ ID NO:4 and fragments of the polypeptide of said polypeptide.

Group III, claim(s)14-15, drawn to polynucleotide comprising SEQ ID NO:5, fragments thereof, polypeptide of SEQ ID NO:6 and fragments of the polypeptide of said polypeptide.

Group IV, claim(s)16-17, drawn to polynucleotide comprising SEQ ID NO:7, fragments thereof, polypeptide of SEQ ID NO:8 and fragments of the polypeptide of said polypeptide.

Group V, claim(s)18-19, drawn to polynucleotide comprising SEQ ID NO:9, fragments thereof, polypeptide of SEQ ID NO:10 and fragments of the polypeptide of said polypeptide.

Group VI, claim(s)20-21, drawn to polynucleotide comprising SEQ ID NO:11, fragments thereof, polypeptide of SEQ ID NO:12 and fragments of the polypeptide of said polypeptide.

Group VII, claim(s)22-23, drawn to polynucleotide comprising SEQ ID NO:13, fragments thereof, polypeptide of SEQ ID NO:14 and fragments of the polypeptide of said polypeptide.

Group VIII, claim(s)24-25, drawn to polynucleotide comprising SEQ ID NO:15, fragments thereof, polypeptide of SEQ ID NO:16 and fragments of the polypeptide of said polypeptide.

Group IX, claim(s)26-27, drawn to polynucleotide comprising SEQ ID NO:17, fragments thereof, polypeptide of SEQ ID NO:18 and fragments of the polypeptide of said polypeptide.

Group X, claim(s)28-29, drawn to polynucleotide comprising SEQ ID NO:19, fragments thereof, polypeptide of SEQ ID NO:20 and fragments of the polypeptide of said polypeptide.

Group XI, claim(s)30-31, drawn to polynucleotide comprising SEQ ID NO:21, fragments thereof, polypeptide of SEQ ID NO:22 and fragments of the polypeptide of said polypeptide.

Group XII, claim(s)32-33, drawn to polynucleotide comprising SEQ ID NO:23, fragments thereof, polypeptide of SEQ ID NO:24 and fragments of the polypeptide of said polypeptide.

Group XIII, claim(s)34-35, drawn to polynucleotide comprising SEQ ID NO:25, fragments thereof, polypeptide of SEQ ID NO:26 and fragments of the polypeptide of said polypeptide.

Group XIV, claim(s)36-37, drawn to polynucleotide comprising SEQ ID NO:27, fragments thereof, polypeptide of SEQ ID NO:28 and fragments of the polypeptide of said polypeptide.

Group XV, claim(s)38-39, drawn to polynucleotide comprising SEQ ID NO:29, fragments thereof, polypeptide of SEQ ID NO:30 and fragments of the polypeptide of said polypeptide.

Group XVI, claim(s)40-41, drawn to polynucleotide comprising SEQ ID NO:31, fragments thereof, polypeptide of SEQ ID NO:32 and fragments of the polypeptide of said polypeptide.

Group XVII, claim(s)42-43, drawn to polynucleotide comprising SEQ ID NO:33, fragments thereof, polypeptide of SEQ ID NO:34 and fragments of the polypeptide of said polypeptide.

Group XVIII, claim(s)44-45, drawn to polynucleotide comprising SEQ ID NO:35, fragments thereof, polypeptide of SEQ ID NO:36 and fragments of the polypeptide of said polypeptide.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US99/19351

Group XIX, claim(s)46-47, drawn to polynucleotide comprising SEQ ID NO:37, fragments thereof, polypeptide of SEQ ID NO:38 and fragments of the polypeptide of said polypeptide.

Group XX, claim(s)48-49, drawn to polynucleotide comprising SEQ ID NO:39, fragments thereof, polypeptide of SEQ ID NO:40 and fragments of the polypeptide of said polypeptide.

Group XXI, claim(s)50-51, drawn to polynucleotide comprising SEQ ID NO:41, fragments thereof, polypeptide of SEQ ID NO:42 and fragments of the polypeptide of said polypeptide.

Group XXII, claim(s)52-53, drawn to polynucleotide comprising SEQ ID NO:43, fragments thereof, polypeptide of SEQ ID NO:44 and fragments of the polypeptide of said polypeptide.

Group XXIII, claim(s)54-55, drawn to polynucleotide comprising SEQ ID NO:45, fragments thereof, polypeptide of SEQ ID NO:46 and fragments of the polypeptide of said polypeptide.

Group XXIV, claim(s)56-57, drawn to polynucleotide comprising SEQ ID NO:47, fragments thereof, polypeptide of SEQ ID NO:48 and fragments of the polypeptide of said polypeptide.

Group XXV, claim(s)58-59, drawn to polynucleotide comprising SEQ ID NO:49, fragments thereof, polypeptide of SEQ ID NO:50 and fragments of the polypeptide of said polypeptide.

Group XXVI, claim(s)60-61, drawn to polynucleotide comprising SEQ ID NO:51, fragments thereof, polypeptide of SEQ ID NO:52 and fragments of the polypeptide of said polypeptide.

Group XXVII, claim(s)62-63, drawn to polynucleotide comprising SEQ ID NO:53, fragments thereof, polypeptide of SEQ ID NO:54 and fragments of the polypeptide of said polypeptide.

Group XXVIII, claim(s)64-65, drawn to polynucleotide comprising SEQ ID NO:55, fragments thereof, polypeptide of SEQ ID NO:56 and fragments of the polypeptide of said polypeptide.

Group XXIX, claim(s)66-67, drawn to polynucleotide comprising SEQ ID NO:57, fragments thereof, polypeptide of SEQ ID NO:58 and fragments of the polypeptide of said polypeptide.

Group XXX, claim(s)68-69, drawn to polynucleotide comprising SEQ ID NO:59, fragments thereof, polypeptide of SEQ ID NO:60 and fragments of the polypeptide of said polypeptide.

Group XXXI, claim(s)70-71, drawn to polynucleotide comprising SEQ ID NO:61, fragments thereof, polypeptide of SEQ ID NO:62 and fragments of the polypeptide of said polypeptide.

Group XXXII, claim(s)72-73, drawn to polynucleotide comprising SEQ ID NO:63, fragments thereof, polypeptide of SEQ ID NO:64 and fragments of the polypeptide of said polypeptide.

Group XXXIII, claim(s)74-75, drawn to polynucleotide comprising SEQ ID NO:65, fragments thereof, polypeptide of SEQ ID NO:66 and fragments of the polypeptide of said polypeptide.

Group XXXIV, claim(s)76-77, drawn to polynucleotide comprising SEQ ID NO:67, fragments thereof, polypeptide of SEQ ID NO:68 and fragments of the polypeptide of said polypeptide.

Group XXXV, claim(s)78-79, drawn to polynucleotide comprising SEQ ID NO:69, fragments thereof, polypeptide of SEQ ID NO:70 and fragments of the polypeptide of said polypeptide.

Group XXXVI, claim(s)80-81, drawn to polynucleotide comprising SEQ ID NO:71, fragments thereof, polypeptide of SEQ ID NO:72 and fragments of the polypeptide of said polypeptide.

Group XXXVII, claim(s)82-83, drawn to polynucleotide comprising SEQ ID NO:73, fragments thereof, polypeptide of SEQ ID NO:74 and fragments of the polypeptide of said polypeptide.

Group XXXVIII, claim(s)84-85, drawn to polynucleotide comprising SEQ ID NO:75, fragments thereof, polypeptide of SEQ ID NO:76 and fragments of the polypeptide of said polypeptide.

Group XXXIX, claim(s)86-87, drawn to polynucleotide comprising SEQ ID NO:77, fragments thereof, polypeptide of



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US99/19351

SEQ ID NO:78 and fragments of the polypeptide of said polypeptide.

Group XL, claim(s)88-89, drawn to polynucleotide comprising SEQ ID NO:79, fragments thereof, polypeptide of SEQ ID NO:80 and fragments of the polypeptide of said polypeptide.

The inventions listed as Groups I-XL do not relate to a single inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: The main invention is Group I, which is first product, first method of making the product and first method of using the product. Pursuant to 37 CFR 1.474 (d), these claims are considered by the ISA/US to constitute the main invention. The products of Groups II-XL do not share the same or corresponding special technical feature with group I because they are drawn to products having materially different structures and functions, each defines a separate invention over the art. Therefore, the claims are not linked by a special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2 so as to form a single inventive concept.





担当	C・M		Pat・M	部長
	(印)			

特許協力条約

14

発信人 日本国特許庁 (国際予備審査機関)

出願人代理人

高橋 秀一

殿

あて名

〒 532-0024

大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85  
武田薬品工業株式会社大阪工場内

01.4.20

PCT見解書

(法第13条)  
[PCT規則66]

受付

01.2.22

知的財産部

発送日  
(日.月.年)

20.02.01

出願人又は代理人  
の書類記号

2633WOOP

応答期間

上記発送日から 2 月以内

国際出願番号

PCT/JPO0/05684

国際出願日

(日.月.年) 24.08.00

優先日

(日.月.年) 27.08.99

国際特許分類 (IPC) Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C12N15/09, C07K14/705, C07K16/28,

C12P21/02, A61K45/00, A61P43/00, G01N33/566, G01N33/15, G01N33/50

出願人 (氏名又は名称)

武田薬品工業株式会社

1. これは、この国際予備審査機関が作成した 1 回目の見解書である。
2. この見解書は、次の内容を含む。
- I ☒ 見解の基礎
  - II ☐ 優先権
  - III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解の不作成
  - IV ☐ 発明の単一性の欠如
  - V ☒ 法第13条 (PCT規則66.2(a)(ii)) に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
  - VI ☒ ある種の引用文献
  - VII ☐ 国際出願の不備
  - VIII ☒ 国際出願に対する意見
3. 出願人は、この見解書に回答することが求められる。
- いつ? 上記応答期間を参照すること。この応答期間に間に合わないときは、出願人は、法第13条 (PCT規則66.2(d)) に規定するとおり、その期間の経過前に国際予備審査機関に期間延長を請求することができる。ただし、期間延長が認められるのは合理的な理由があり、かつスケジュールに余裕がある場合にに限られることに注意されたい。
- どのように? 法第13条 (PCT規則66.3) の規定に従い、答弁書及び必要な場合には、補正書を提出する。補正書の様式及び言語については、法施行規則第62条 (PCT規則66.8及び66.9) を参照すること。
- なお 補正書を提出する追加の機会については、法施行規則第61条の2 (PCT規則66.4) を参照すること。補正書及び/又は答弁書の審査官による考慮については、PCT規則66.4の2を参照すること。審査官との非公式の連絡については、PCT規則66.6を参照すること。
- 回答がないときは、国際予備審査報告は、この見解書に基づき作成される。
4. 国際予備審査報告作成の最終期限は、PCT規則69.2の規定により 27.12.01 である。

名称及びあて先

日本国特許庁 (IPEA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

六笠 紀子

4B

9735

電話番号 03-3581-1101 内線 3448



## I. 見解の基礎

1. この見解書は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に回答するために提出された差替え用紙は、この見解書において「出願時」とする。)

☒ 出願時の国際出願書類

- |                                     |         |        |                      |
|-------------------------------------|---------|--------|----------------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 _____ | ページ、   | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 _____ | ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書        | 第 _____ | ページ、   | 付の書簡と共に提出されたもの       |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | PCT19条の規定に基づき補正されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | 付の書簡と共に提出されたもの       |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 _____ | ページ/図、 | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 _____ | ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面         | 第 _____ | ページ/図、 | 付の書簡と共に提出されたもの       |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、   | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、   | 付の書簡と共に提出されたもの       |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
- ☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
- ☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき見解書を作成した。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
- ☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- ☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
- ☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- ☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
- ☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項
- ☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この見解書は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c))



## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第13条(PCT規則66.2(a)(ii)に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	1-14	有
	請求の範囲		無
進歩性(IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-14	無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1-14	有
	請求の範囲		無

## 2. 文献及び説明

引用文献1: LIBERT, F. et al. "Selective amplification and cloning of four new members of the G protein-coupled receptor family",  
Science (1989)第244巻, 第4904号, p. 569-572

引用文献2: EP, 877083, A (SMITHKLINE BEECHAM CORP.)  
11.11月. 1998(11.11.98) & JP, 11-75870, A

請求の範囲 1-14

引用文献1には、公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質において保存されている配列をもとにプライマーを作製し、該プライマーを用いてcDNAライブラリーから新規のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をクローニングしてDNA配列及びアミノ酸配列を決定したことが記載されている。

引用文献2には、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を同定する際に由来としてヒト脳を用いたことが記載されている。

ここで、引用文献2のようにヒト脳からG蛋白質共役型レセプター蛋白質を同定すること、この際に引用文献1に記載されたように公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質において保存されている配列をもとにプライマーを作製して新規のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を同定することは当業者が容易に想到し得たものと認められ、このようにして得られる新規なG蛋白質共役型レセプター蛋白質と比較して、本願において単離された特定のG蛋白質共役型レセプター蛋白質は格別予想もできない効果を奏するものとも認められない。

また、得られた蛋白質に対する抗体を作製すること、リガンドを決定すること、リガンドとの結合性をかえる化合物をスクリーニングすること等は当業者が必要に応じて適宜なし得たものと認める。

従って、請求の範囲1乃至14に係る発明は引用文献1及び2の記載に基づいて当業者が容易になし得たものと認める。



## VI. ある種の引用文献

## 1. ある種の公表された文書(PCT規則70.10)

出願番号 特許番号	公知日 (日. 月. 年)	出願日 (日. 月. 年)	優先日 (有効な優先権の主張) (日. 月. 年)
WO, 00/11015, A1 「E, X」	02. 03. 00	24. 08. 99	24. 08. 98
WO, 00/22131, A2 「E, X」	20. 04. 00	13. 10. 99	13. 10. 98

## 2. 書面による開示以外の開示(PCT規則70.9)

書面による開示以外の開示の種類	書面による開示以外の開示の日付 (日. 月. 年)	書面による開示以外の開示に言及している 書面の日付 (日. 月. 年)
-----------------	------------------------------	--





## VII. 国際出願に対する意見

請求の範囲、明細書及び図面の明瞭性又は請求の範囲の明細書による十分な裏付についての意見を次に示す。

一般に、所望の性質を特定することのみで、その性質を有する化合物自体を把握することは困難であるため、化学構造等の有効成分を得るための手がかりが記載されていない明細書は、発明の実施に必要な有効成分の入手過程において、無数の化合物を製造、スクリーニングして、当該性質を有するか否かを確認するという当業者に期待し得る程度を超える試行錯誤を求めるものであり、当業者が発明を実施することができる程度に明確かつ十分に記載されていないものと判断される。

これを本願明細書についてみると、化合物を識別するためのスクリーニング方法は記載されているものの、該方法により得られた化合物の具体例、及び、該化合物を得るための化学構造等の手がかりが記載されておらず、かつ、それが出願時に当業者に推認できたものとも認められないので、請求の範囲 1 2 に包含される有効成分を当業者が理解できず、発明の実施にあたり、無数の化合物を製造、スクリーニングして確認するという当業者に期待し得る程度を超える試行錯誤を求めるものである。

請求の範囲 1 3 についても同様である。

したがって、発明の詳細な説明は、請求の範囲 1 2 及び 1 3 に係る発明を当業者が実施できる程度に明確かつ十分に記載されていない。



# 注 意

提出書類の様式及び作成要領について

答弁書及び手続補正書は、特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律施行規則第62条（様式第23）及び同規則第31条（様式15）に従って作成して下さい。

【備考】

- 1 用紙は、日本工業規格A列4番（横21cm、縦29.7cm）の大きさとし、可機性のある、丈夫な、白色の、滑らかな、光沢のない、耐久性のあるものを縦長にして、折らずに片面のみを用い、用紙には、不要な文字、記号、枠線、けい線等を記載してはならない。
- 2 用紙には、しわ及び裂け目があるてはならない。
- 3 余白は、少なくとも用紙の上端、右端及び左端におおの2cm並びに左端に2.5cmをとるものとし、原則としてその上端及び左端についてはおおの4cm並びにその右端及び下端についてはおおの3cmを越えないものとする。この場合において、余白は、完全な空白としておくこととする。ただし、上端の余白の左端であって上端から1.5cm以内に書類記号（願書に記載されている場合に限り。）を付すことができる。
- 4 茶弁書は、タイプ印字又は印刷によるものとし、写真、静電的方法、写真オフセット及びマイクロフィルムによって直接に任意の倍数の複製をすることができるように作成する。
- 5 茶弁書のすべての用紙には、アラビア数字により1から始まる連続番号を用紙（余白部分を除く。）の上端又は左端の中央に付す。
- 6 タイプ印字による場合において、行の間隔は、少なくとも5mm以上をとる。ただし、備考1、1、1、4においてローマ字を用いるときは、1.5文字の幅をとる。
- 7 記載事項は、4号活字の大きさの文字（備考1、1、1、4においてローマ字を用いるときは、大文字の大きさが縦0.21cm以上の文字）により、かつ、暗色の退色性のない色であって備考4に定める要件を満たすもので記載する。
- 8 「国際出願の表示」の欄には、既に特許庁から国際出願番号の通知を受けている場合には、その番号（「PCT」/「P」/「O」/「O」/「O」）のように記載し、国際出願番号の通知を受ける前の場合には、その国際出願の提出日を日付の順に「〇〇、〇〇、〇〇」の順に国際出願（年については西暦の下2桁）のように記載するとともに、書類番号（願書に記載されている場合に限り。）を含めて記載する。
- 9 「氏名（名称）」は、自然人にあっては姓及び名を姓、名の順に記載し、また、法人にあってはその名称を記載する。
- 10 「あて名」は、「日本国、何県、何郡、何村、大字何、字何、何番地、何号」のように詳しく記載するとともに、郵便番号を記載する。
- 11 氏名若しくは名称又はあて名には、これらの音訳又は英語への翻訳をローマ字を用いて併記する。
- 12 「国籍」は、出願人又は代表者がその国民である国の国名を記載する。
- 13 「住所」は、出願人又は代表者がその居住者である国の国名を記載する。
- 14 国名を記載する場合においては、特許庁長官が指定する国の名称を日本語及び英語により表示する。
- 15 「代理人」の欄には、その氏名の記載に合わせて、その氏名の前に「弁護士」、「弁理士」又は「法定代理人」のうち該当するものを記載する。
- 16 代理人によるときは本人の印は不要とし、代理人によらないときは「代理人」の欄を設けるには及ばない。
- 17 各用紙においては、原則として抹消、訂正、重ね書き及び行間挿入を行ってはならない。
- 18 茶弁書の用紙は、容易に分離し、又はとじ直すことができるように例えばクリップ等を用いてとじる。
- 19 「あて名」は出願人、代表者、代理人又は復代理人各人ごとに1つのあて名のみを記載する。
- 20 「復代理人」の欄には、その氏名の記載に合わせて、その氏名の前に「弁護士」又は「弁理士」のうち該当するものを記載する。
- 21 復代理人によるときは代理人の印は不要とし、復代理人によらないときは「復代理人」の欄を設けるには及ばない。
- 22 日付は、西暦元及びグレゴリー暦により、日についての数字、月についての数字及び年についての最後から2つの数字をこの順序に従ってそれぞれについて2桁のアラビア数字で表示し、かつ、日及び月の数字の後にピリオドを付す（例えば1978年3月30日は「3.0.3.78」）。他の元又は暦を用いる場合には、西暦元及びグレゴリー暦による日付を併記する。

様式第23（第62条関係）

答 弁 書	
特許庁審査官 殿	
1	国際出願の表示
2	出願人（代表者） 氏名（名称） あて名 国籍 住所
3	代理人 氏名 あて名
4	通知の日付
5	茶弁の内容
6	添付書類の目録

【備考】

- 1 法第5条の規定による命令に基づき補正をするときは表題を「手続補正書（法第6条の規定による命令に基づく補正）」とし、法第11条の規定により補正をするときは「手続補正書（法第11条の規定による補正）」とし、令第1条第2項の規定による命令に基づき補正をするときは「手続補正書（令第1条第2項の規定による命令に基づく補正）」とし、第27条の3第1項の規定により補正をするときは「手続補正書（第27条の3第1項の規定による補正）」とし、第28条第1項の規定による命令に基づく補正をするときは「手続補正書（第28条第1項の規定による命令に基づく補正）」とし、第50条の3第3項の規定によりフレキシブルディスクを提出するときは、「第50条の3第5項の規定による命令に基づきフレキシブルディスクを提出する」とし、「第50条の3第5項の規定による命令に基づきフレキシブルディスクを提出する」とし、第50条の3第5項の規定による命令に基づき配列表を記載した書面の提出書」とし、第50条の3第8項の規定による命令に基づき補正をするときは、「手続補正書（第50条の3第8項の規定による命令に基づく補正）」とする。
- 2 提出先は、特許庁審査官が茶弁書の提出又は補正の機会を付した場合には当該特許庁審査官、その他の場合には、特許庁長官とする。
- 3 「補正の対象」の欄には、「願書の別、出願の欄」のように補正をする書類名と補正をする箇所を記載する。
- 4 「補正の内容」の欄には、「別紙のとおり」と記載するとともに補正事項を指摘し、補正のための添付用紙を別紙として添付する。ただし、補正の結果、用紙の全体が削除されることとなる場合、法第6条、令第1条第2項、第28条第1項若しくは第50条の3第8項の規定による命令に基づく手続の補正の場合又は第27条の3第1項の規定による手続の補正の場合であって、その補正に係る事項についての記載原本への書き換えが容易にできるときは別紙添付用紙によることを要しない。なお、法第11条の規定による補正のための添付用紙を添付する場合には、その補正に係る事項が、一部の箇所の削除又は修正に止まる場合は追加である場合には、用紙の明りょうさ及び直接複製に支障を及ぼさないことを条件として、先に提出した補正書の写しに補正をすることにより、添付用紙とすることができる。

- 5 請求の範囲について補正をするときは、当該補正に係る請求の範囲を次のように記載した差替え用紙を添付する。
- イ 新たに請求の範囲を追加するときは、その追加する請求の範囲に補正前の請求の範囲の最後のものに付した番号を「〇（追加）」のように記載する。
- ロ いずれかの請求の範囲を削除するときは、その削除する請求の範囲に付されている番号を「〇（削除）」のように記載する。
- ハ 請求の範囲の数を増減せずに補正するときは、その補正された請求の範囲に補正前の請求の範囲の番号と同一の番号を「〇（補正後）」のように記載する。
- 6 第50条の3第3項の規定によりフレキシブルディスクを提出するときは、第50条の3第5項の規定による命令に基づき配列表を記載した書面を提出するときは、次の要領に記載する。
- イ 「7 添付書類の目録」の欄に次のように記載する。

- 5 添付書類の目録 1 配列表に関するコードデータを記録したフレキシブルディスク 1枚
- 2 補正書 1通
- 3 フレキシブルディスクの記録形式等の情報を記載した書面 1通

ロ 「補正書」は、原則として次の文例により作成する。「国際出願の表示」の項目は、備考15に従って記載する。

（文例）

補正書

平成 年 月 日

特許庁長官 殿

国際出願の表示

発明の名称

特許出願人・代理人

（印）

- ハ 「フレキシブルディスクの記録形式等の情報を記載した書面」は、原則として、「出願人氏名（名称）」、「代理人氏名（名称）」、「国際出願の表示」、「発明の名称」、「使用した文字コード」、「配列を記録したファイル名」及び「連絡先（電話番号及び担当者の氏名）」の項目を設けて記載することにより作成する。
- ニ 「5 補正の対象」及び「6 補正の内容」の欄は設けない。
- 7 第50条の3第5項の規定による命令に基づき配列表を記載した書面を提出するときは、「7 添付書類の目録」の欄に次のように記載し、「5 補正の対象」及び「6 補正の内容」の欄は設けない。

- 5 添付書類の目録 1 配列表を記録した書面 1通

- 8 用紙は、日本工業規格A列4番（横21cm、縦29.7cm）の大きさとし、可機性のある、丈夫な、白色の、滑らかな、光沢のない、耐久性のあるものを縦長にして、折らずに片面のみを用い、用紙には、不要な文字、記号、枠線、けい線等を記載してはならない。

- 9 用紙には、しわ及び裂け目があるてはならない。
- 10 余白は、少なくとも用紙の上端、右端及び左端におおの2cm並びに左端に2.5cmをとるものとし、原則としてその上端及び左端についてはおおの4cm並びにその右端及び下端についてはおおの3cmを越えないものとする。この場合において、余白は、完全な空白としておくこととする。ただし、上端の余白の左端であって上端から1.5cm以内に書類記号（願書に記載されている場合に限り。）を付すことができる。

- 11 手続補正書は、タイプ印字又は印刷によるものとし、写真、静電的方法、写真オフセット及びマイクロフィルムによって直接に任意の倍数の複製をすることができるように作成する。
- 12 手続補正書のすべての用紙には、アラビア数字により1から始まる連続番号を用紙（余白部分を除く。）の上端又は左端の中央に付す。
- 13 タイプ印字による場合において、行の間隔は、少なくとも5mm以上をとる。ただし、備考1、1、1、4においてローマ字を用いるときは、1.5文字の幅をとる。
- 14 記載事項は、4号活字の大きさの文字（備考1、1、1、4においてローマ字を用いるときは、大文字の大きさが縦0.21cm以上の文字）により、かつ、暗色の退色性のない色であって備考4に定める要件を満たすもので記載する。

- 15 「国際出願の表示」の欄には、既に特許庁から国際出願番号の通知を受けている場合には、その番号（「PCT」/「P」/「O」/「O」/「O」）のように記載し、国際出願番号の通知を受ける前の場合には、その国際出願の提出日を日付の順に「〇〇、〇〇、〇〇」の順に国際出願（年については西暦の下2桁）のように記載するとともに、書類番号（願書に記載されている場合に限り。）を含めて記載する。
- 16 「氏名（名称）」は、自然人にあっては姓及び名を姓、名の順に記載し、また、法人にあってはその名称を記載する。
- 17 「あて名」は、「日本国、何県、何郡、何村、大字何、字何、何番地、何号」のように詳しく記載するとともに、郵便番号を記載する。
- 18 氏名若しくは名称又はあて名には、これらの音訳又は英語への翻訳をローマ字を用いて併記する。
- 19 「国籍」は、出願人又は代表者がその国民である国の国名を記載する。
- 20 「住所」は、出願人又は代表者がその居住者である国の国名を記載する。
- 21 国名を記載する場合においては、特許庁長官が指定する国の名称を日本語及び英語により表示する。
- 22 「代理人」の欄には、その氏名の記載に合わせて、その氏名の前に「弁護士」、「弁理士」又は「法定代理人」のうち該当するものを記載する。
- 23 代理人によるときは本人の印は不要とし、代理人によらないときは「代理人」の欄を設けるには及ばない。
- 24 各用紙においては、原則として抹消、訂正、重ね書き及び行間挿入を行ってはならない。
- 25 手続補正書の用紙は、容易に分離し、又はとじ直すことができるように例えばクリップ等を用いてとじる。
- 26 「あて名」は出願人、代表者、代理人又は復代理人各人ごとに1つのあて名のみを記載する。

- 27 「復代理人」の欄には、その氏名の記載に合わせて、その氏名の前に「弁護士」又は「弁理士」のうち該当するものを記載する。
- 28 復代理人によるときは代理人の印は不要とし、復代理人によらないときは「復代理人」の欄を設けるには及ばない。
- 29 日付は、西暦元及びグレゴリー暦により、日についての数字、月についての数字及び年についての最後から2つの数字をこの順序に従ってそれぞれについて2桁のアラビア数字で表示し、かつ、日及び月の数字の後にピリオドを付す（例えば1978年3月30日は「3.0.3.78」）。他の元又は暦を用いる場合には、西暦元及びグレゴリー暦による日付を併記する。

様式第15（第31条関係）

手 続 補 正 書	
特許庁長官 殿	
（特許庁審査官 殿）	
1	国際出願の表示
2	出願人（代表者） 氏名（名称） あて名 国籍 住所
3	代理人 氏名 あて名
4	補正命令の日付
5	補正の対象
6	補正の内容
7	添付書類の目録



P C T

## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 2633WOOP	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/05684	国際出願日 (日.月.年) 24.08.00	優先日 (日.月.年) 27.08.99
出願人(氏名又は名称) 武田薬品工業株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

- a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。  
☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。
- b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。  
☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。  
☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。  
☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、  
 第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。 ☒ なし  
☐ 出願人は図を示さなかった。  
☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>7</sup> C12N15/12, C12N15/09, C07K14/705, C07K16/28,  
C12P21/02, A61K45/00, A61P43/00, G01N33/566,  
G01N33/15, G01N33/50

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>7</sup> C12N15/12, C12N15/09, C07K14/705, C07K16/28,  
C12P21/02, A61K45/00, A61P43/00, G01N33/566,  
G01N33/15, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	WO, 00/11015, A1 (ALPHAGENE, INC) 2. 3月. 2000 (02. 03. 00) &AU, 9957847, A	1 - 14
P, X	WO, 00/22131, A2 (BEHAN, Dominic, P. et al) 20. 4月. 2000 (20. 04. 00) &AU, 9962991, A	1 - 14

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12. 12. 00

国際調査報告の発送日

19.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

六笠 紀子

4 B

9735

電話番号 03-3581-1101 内線 3448





C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	LIBERT, F. et al. "Selective amplification and cloning of four new members of the G protein-coupled receptor family", Science (1989)第244巻, 第4904号, p. 569-572	1-14
Y	NOTHACKER, H. P. et al. "Molecular cloning of a novel, putative G protein-coupled receptor from sea anemones structurally related to members of the FSH, TSH, LH/CG receptor family from mammals", BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. (1993)第197巻, 第3号, p. 1062-1069	1-14
Y	EP, 877083, A (SMITHKLINE BEECHAM CORP.) 11. 11月. 1998 (11. 11. 98) & JP, 11-75870, A	1-14
Y	WO, 97/24436, A2 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) 10. 7月. 1997 (10. 07. 97) & AU, 1208497, A & JP, 10-146192, A & EP, 870020, A & CN, 1207126, A	1-14



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP00/05684	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl. C12N15/12, C12N15/09, C07K14/705, C07K16/28, C12P21/02, A61K45/00, A61P43/00, G01N33/566, G01N33/15, G01N33/50	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int. Cl. C12N15/12, C12N15/09, C07K14/705, C07K16/28, C12P21/02, A61K45/00, A61P43/00, G01N33/566, G01N33/15, G01N33/50	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) GenBank/EMBL/DBJ/GenSeq, BIOSIS (DIALOG), MPI (DIALOG)	

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P. X	WO, 00/11015, A1 (ALPHAGEN, INC), 02 March, 2000 (02.03.00) & AU, 9957847, A	1-14
P. X	WO, 00/22131, A2 (BERAN, Dominic, P. et al.), 20 April, 2000 (20.04.00) & AU, 9962991, A	1-14
Y	LIBERT, F. et al., "Selective amplification and cloning of four new members of the G protein-coupled receptor family", Science (1989), Vol. 244, No. 4904, pp.569-572	1-14
Y	NOTHACKER, H. P. et al., "Molecular cloning of a novel, putative G protein-coupled receptor from sea anemones structurally related to members of the FSH, TSH, LH/CG receptor family from mammals", BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. (1993) Vol.197, No.3, pp.1062-1069	1-14
Y	EP, 877083, A (SMITHKLINE BEECHAM CORP.), 11 November, 1998 (11.11.98) & JP, 11-75870, A	1-14

<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family series.	
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	
Date of the actual completion of the international search 12 December, 2000 (12.12.00)	Date of mailing of the international search report 19 December, 2000 (19.12.00)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP00/05684		
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO, 97/24436, A2 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.), 10 July, 1997 (10.07.97) & AU, 1208497, A & JP, 10-146192, A & EP, 870020, A & CN, 1207126, A	1-14



(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

WO 01/16316 A1

(19) 世界的な所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001年3月8日 (08.03.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/16316 A1

(5) 国際特許分類: C12N 15/12, L12D1 (JP/PI); 千341-0045 大阪府大阪市中央区道徳町

15/09, C01K 14/705, 16/28, C12P 21/02, A61K 45/00, 四丁目1番1号 Osaka (JP).

A61F 43/00, C01N 33/566, 33/15, 33/58

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/05684

(72) 発明者: および

(22) 国際出願日: 2000年8月24日 (24.08.2000)

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 葛辺卓也 (WATANABE, Takuya) (JP/PI); 千332-0033 大阪府大

(25) 国際出願の言語: 日本語

阪市淀川区新富6丁目14番9-8904号 Osaka (JP); 船地

(26) 国際公開の言語: 日本語

久仁子 (KIKUCHI, Kunitoko) (JP/PI); 千302-0024 茨城

(30) 優先権データ:

(SHINTANI, Yutaka) (JP/PI); 千305-0821 茨城県つく

特願平1/241530 1999年8月27日 (27.08.1999) JP (74) 代理人: 井邊士 高橋秀一 外(TAKAHASHI, Shuichi

et al.); 千332-0024 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品

目17番85号 武田薬品工業株式会社 大阪工場内 Osaka

工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, (JP)

(特許有)

(54) Title: NOVEL G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR PROTEIN AND DNA THEREOF

(54) 発明の名称: 新規G蛋白質共役型セブタン-蛋白質およびそのDNA

(57) Abstract: A human-origin protein or its salt, a DNA encoding this protein, a method of determining a ligand to the above protein, a method for screening compounds capable of altering the binding properties of the ligand to the protein, the compounds obtained by the screening or salts thereof, etc. The above-described human-origin protein or the DNA encoding the same can be used in: (1) determining a ligand to this protein; (2) preventing and/or remedies for diseases in association with the dysfunction of the above protein; (3) screening compounds (agonists, antagonists, etc.) capable of altering binding properties of the ligand to the protein, etc.

(57) 要約:

ヒト由来の蛋白質またはその塩、該蛋白質をコードするDNA、該蛋白質に  
対するリガンドの決定方法、リガンドと該蛋白質との結合性を変化させる化  
物のスクリーニング方法/スクリーニング用キット、該スクリーニングで得ら  
れる化合物またはその塩などに関する。

本発明のヒト由来の蛋白質またはそれをコードするDNAは、(1) 本発明  
の蛋白質に対するリガンドの決定、(2) 本発明の蛋白質の機能不全に関連す  
る疾患の予防および/または治療剤、(3) 本発明の蛋白質とリガンドとの結  
合性を変化させる化合物 (アゴニスト、アンタゴニストなど) のスクリーニン  
グなどに用いることができる。

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,  
BR, BY, BZ, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, DZ, EE, GD, GE, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LT, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)  
LV, MA, MD, MG, MK, MN, MX, NZ, NO, NZ, PL, RO,  
RU, SC, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU,  
ZA.

送付公開書類:  
国際調査報告書

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, 2文字コード及び他の略語については、定規を参照され  
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーロパ特許 (AM, 各PCTワセットの表に掲載されている「コードと略語  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RO, RU, TJ, TN, ユーロッパ特許 のガイドライン」を参照。

WO 01/16316 A1

## 明細書

新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質およびそのDNA

## 5 技術分野

本発明は、ヒト脳由来の新規蛋白質（G蛋白質共役型レセプター蛋白質）またはその塩およびそれをコードするDNAなどに関する。

## 背景技術

10 多くのホルモンや神経伝達物質は、細胞膜に存在する特異的なレセプター蛋白質を通じて生体の機能を調節している。これらのレセプター蛋白質の多くは共役しているguanine nucleotide-binding protein（以下、G蛋白質と略称する場合がある）の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行ない、また7個の膜貫通領域を有する共通した構造をもっていることから、G蛋白質共役型レセプター蛋白質あるいは7回膜貫通型レセプター蛋白質と総称される。

15 G蛋白質共役型レセプター蛋白質は生体の細胞や臓器の各機能細胞表面に存在し、それら生体の細胞や臓器の機能を調節する分子、例えばホルモン、神経伝達物質および生理活性物質等の標的として非常に重要な役割を担っている。

20 各種生体の細胞や臓器の内の複雑な機能を調節する物質と、その特異的なレセプター蛋白質、特にG蛋白質共役型レセプター蛋白質との関係を明らかにすることは、各種生体の細胞や臓器の機能を解明し、それら機能と密接に関連した医薬品開発に非常に重要な手段を提供することとなる。

例えば、脳などの中枢神経系の器官では、多くのホルモン、ホルモン様物質、神経伝達物質あるいは生理活性物質などによる調節のもとで脳の生理的な機能の調節が行なわれている。特に、神経伝達物質は脳内の様々な部位に存在し、それぞれに対応するレセプター蛋白質を通してその生理機能の調節を行っている。脳内には未だ未知の神経伝達物質も多く、そのレセプター蛋白質をコードするcDNAの構造に関しても、これまで報告されていないものも多いと考え

られる。さらに、既知のレセプター蛋白質のサブタイプが存在するかどうかについても分かっていなかった。

5 脳における複雑な機能を調節する物質と、その特異的なレセプター蛋白質との関係を明らかにすることは、医薬品開発に非常に重要な手段である。また、レセプター蛋白質に対するアゴニスト、アンタゴニストを効率よくスクリーニングし、医薬品を開発するためには、脳内で発現しているレセプター蛋白質の遺伝子の機能を解明し、それらを適当な発現系で発現させることが必要であった。

近年、生体内で発現している遺伝子を解析する手段として、cDNAの配列をランダムに解析する研究が活発に行なわれており、このようにして得られたcDNAの断片配列がExpressed Sequence Tag（EST）としてデータベースに登録され、公開されている。しかし、多くのESTは配列情報のみであり、その機能を推定することは困難である。

## 発明の開示

15 本発明は、ヒト脳由来の新規蛋白質（G蛋白質共役型レセプター蛋白質）、その部分ペプチドまたはそれらの塩、該蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNAを含有するDNA、該DNAを含有する組換えベクター、該組換えベクターで形質転換された形質転換体、該蛋白質またはその塩の製造法、該蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体、該蛋白質（G蛋白質共役型レセプター蛋白質）に対するリガンドの決定方法、リガンドと該蛋白質（G蛋白質共役型レセプター蛋白質）との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、該スクリーニング用キット、該スクリーニング方法もしくはスクリーニングキットを用いて得られるリガンドと該蛋白質（G蛋白質共役型レセプター蛋白質）との結合性を变化させる化合物またはその塩、およびリガンドと該蛋白質（G蛋白質共役型レセプター蛋白質）との結合性を变化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬などを提供する。

25 本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、ヒト脳由来の新規な蛋白質（G蛋白質共役型レセプター蛋白質）をコードするcDNAを単離し、全塩基配列を解

3

析することに成功した。そして、この塩基配列をアミノ酸配列に翻訳したところ、第1〜第7膜貫通領域が疎水性プロット上で確認され、これらのcDNAにコードされる蛋白質が7回膜貫通型のG蛋白質共役型セクター蛋白質であることを確認した(図3)。本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

- (1) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする蛋白質またはその塩、
- (2) 上記(1)記載の蛋白質の部分ペプチドまたはその塩、
- (3) 上記(1)記載の蛋白質をコードするDNAを含有するDNA、
- (4) 配列番号：2で表される塩基配列を有する上記(3)記載のDNA、
- (5) 上記(3)記載のDNAを含有する組換えベクター、
- (6) 上記(5)記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、
- (7) 上記(6)記載の形質転換体を培養し、上記(1)記載の蛋白質を生成・蓄積せしめることを特徴とする上記(1)記載の蛋白質またはその塩の製造法、
- (8) 上記(1)記載の蛋白質もしくは上記(2)記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、
- (9) 上記(1)記載の蛋白質もしくは上記(2)記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする上記(1)記載の蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、
- (10) 上記(1)記載の蛋白質もしくは上記(2)記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とするリガンドと上記(1)記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- (11) 上記(1)記載の蛋白質もしくは上記(2)記載の部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とするリガンドと上記(1)記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニングキット、
- (12) 上記(10)記載のスクリーニング方法または上記(11)記載のスクリーニング方法または上記(11)記載のスクリーニングキット

4

クリーニング用キットを用いて得られる、リガンドと上記(1)記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

- (13) 上記(10)記載のスクリーニング方法または上記(11)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、リガンドと上記(1)記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、および
- (14) 上記(3)記載のDNAとハイストリジンゼントな条件下でハイブリダイスするDNAなどを提供する。

より具体的には、

- (15) 蛋白質が、①配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1〜30個程度、より好ましくは1〜9個程度、さらに好ましくは数個(1または2個))のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上(好ましくは、1〜30個程度、より好ましくは1〜10個程度、さらに好ましくは数個(1または2個))のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1〜30個程度、より好ましくは1〜10個程度、さらに好ましくは数個(1または2個))のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質である上記(1)記載の蛋白質またはその塩、
- (16) 上記(1)記載の蛋白質もしくはその塩または上記(2)記載の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする上記(10)記載のリガンドの決定方法、
- (17) リガンドがアンギオテンシン、ボンベンジン、カナビノイド、コリスノキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、ブリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セケリン、グルカゴン、カルシトニン、アプレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP (ペソアクチン) インテグリン、アンチインテグリン、リレイチッド、ポリペプチド、ソマトスタチン、ドーパミン、

5

モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーテ  
 イッドペプチド）、ロイコトリエン、バンクレアスタチン、プロスタグランジ  
 ン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 $\alpha$ および $\beta$ -ケモカイン  
 (chemokine)（例えば、IL-8、GRO $\alpha$ 、GRO $\beta$ 、GRO $\gamma$ 、NAP-  
 2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、  
 MCP-3、I-309、MIP1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTESなど）、  
 エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、  
 バンクレアティソクポリペプチドまたはガラニンである上記（9）記載のリ  
 ガンドの決定方法、

10 (18) (i) 上記（1）記載の蛋白質もしくはその塩または上記（2）記載  
 の部分ペプチドもしくはその塩と、リガンドとを接触させた場合と、(ii) 上  
 記（1）記載の蛋白質もしくはその塩または上記（2）記載の部分ペプチドも  
 しくはその塩と、リガンドおよび試験化合物とを接触させた場合との比較を行  
 なうことを特徴とする上記（11）記載のスクリーニング方法、

15 (19) (i) 標識したリガンドを上記（1）記載の蛋白質もしくはその塩ま  
 たは上記（2）記載の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合と、(ii)  
 標識したリガンドおよび試験化合物を上記（1）記載の蛋白質もしくはその塩  
 または上記（2）記載の部分ペプチドまたはその塩に接触させた場合における、  
 標識したリガンドの上記（1）記載の蛋白質もしくはその塩または上記（2）  
 記載の部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定し、比較することを  
 特徴とするリガンドと上記（1）記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化  
 させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

20 (20) (i) 標識したリガンドを上記（1）記載の蛋白質を含有する細胞に  
 接触させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび試験化合物を上記（1）記  
 載の蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、標識したリガンドの該  
 細胞に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記（1）  
 記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスク  
 リーニング方法、

25

6

(21) (i) 標識したリガンドを上記（1）記載の蛋白質を含有する細胞の  
 膜画分に接触させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび試験化合物を上記

(1) 記載の蛋白質を含有する細胞の膜画分に接触させた場合における、標識  
 したリガンドの該細胞の膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴  
 とするリガンドと上記（1）記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させ  
 る化合物またはその塩のスクリーニング方法、

5 (22) (i) 標識したリガンドを上記（6）記載の形質転換体を培養するこ  
 とによって該形質転換体の細胞膜に発現した蛋白質に接触させた場合と、(ii)  
 標識したリガンドおよび試験化合物を上記（6）記載の形質転換体を培養する  
 ことによって該形質転換体の細胞膜に発現した蛋白質に接触させた場合におけ  
 る、標識したリガンドの該蛋白質に対する結合量を測定し、比較することを特  
 徴とするリガンドと上記（1）記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化さ  
 せる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

10 (23) (i) 上記（1）記載の蛋白質またはその塩を活性化する化合物を上  
 記（1）記載の蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、(ii) 上記（1）  
 記載の蛋白質またはその塩を活性化する化合物および試験化合物を上記（1）  
 記載の蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、蛋白質を介した細胞  
 刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記（1）記載の蛋  
 白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニン  
 グ方法、

20

(24) 上記（1）記載の蛋白質またはその塩を活性化する化合物を上記（6）  
 記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現した蛋  
 白質に接触させた場合と、上記（1）記載の蛋白質またはその塩を活性化する  
 化合物および試験化合物を上記（6）記載の形質転換体を培養することによ  
 って該形質転換体の細胞膜に発現した蛋白質に接触させた場合における、該蛋白  
 質を介する細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記  
 (1) 記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩  
 のスクリーニング方法、

25



- (25) 上記(1) 記載の蛋白質を活性化化する化合物が、アンギオテンジン、ホソベシジン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、グリニン、バソプレジジン、オキシジェニン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドリノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP (バソアクテイド インテグレートアル アンチ リレイテッド ホリベプチド)、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、テラジキニン、CGRP (カルシトニンジーンリレーテッドペプチド)、ロイコトリエン、バンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノジン、アプレナリン、 $\alpha$ および $\beta$ -ケモカイン (chemokine) (例えば、IL-8、GRO $\alpha$ 、GRO $\beta$ 、GRO $\gamma$ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HCL4、MCP-3、I-309、MIP1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTESなど)、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンジン、TRH、バンクレアテクトリポリペプチドまたはガラニンである上記(23) または上記(24) 記載のスクリーニング方法、

- (26) 上記(18) ~ (25) 記載のスクリーニング方法で得られる、リガンドと上記(1) 記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、
- (27) 上記(18) ~ (25) 項記載のスクリーニング方法で得られる、リガンドと上記(1) 記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させるの化合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬、
- (28) 上記(1) 記載の蛋白質を含有する細胞を含有することを特徴とする上記(11) 記載のスクリーニング用キット、
- (29) 上記(1) 記載の蛋白質を含有する細胞の膜画分を含有することを特徴とする上記(11) 記載のスクリーニング用キット、
- (30) 上記(6) 記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現した蛋白質を含有することを特徴とする上記(11) 記載のスク

- リーニング用キット、
- (31) 上記(28) ~ (30) 記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、リガンドと上記(1) 記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、
- (32) 上記(28) ~ (30) 記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、リガンドと上記(1) 記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬、
- (33) 上記(8) 記載の抗体と、上記(1) 記載の蛋白質もしくは上記(2) 記載の部分ペプチドまたはその塩とを接触させることを特徴とする上記(1) 記載の蛋白質もしくは上記(2) 記載の部分ペプチドまたはその塩の定量法、
- (34) 上記(8) 記載の抗体と、被検液および標識化された上記(1) 記載の蛋白質もしくは上記(2) 記載の部分ペプチドまたはその塩とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された上記(1) 記載の蛋白質もしくは上記(2) 記載の部分ペプチドまたはその塩の割合を測定することを特徴とする被検液中の上記(1) 記載の蛋白質もしくは上記(2) 記載の部分ペプチドまたはその塩の定量法、および
- (35) 被検液と担体上に不溶化した上記(8) 記載の抗体および標識化された上記(8) 項記載の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の上記(1) 記載の蛋白質もしくは上記(2) 記載の部分ペプチドまたはその塩の定量法などを提供する。

#### 図面の簡単な説明

- 図1は実施例1で得られた本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするDNAの塩基配列(AQ27)、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す(図2に続く)。

図2は実施例1で得られた本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするDNAの塩基配列(AQ27)、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す(図1

の続き)。

図3は本発明のヒト脳由来蛋白質の疎水性プロットを示す。

図4は実施例2で行われたA027の発現組織分布の解析結果を示す。

図5は実施例3で行われたA027に対するMel-Enkephalin-Arg-Phe amideの反応性の解析結果を示す。縦軸はAcidification rate、横軸は測定サイクルを表わし、●は受容体発現CHO細胞の、○はmock細胞の反応性を示す。

発明の実施をするための最良の形態

本発明の蛋白質 (G蛋白質共役型レセプター蛋白質) は、配列番号: 1で表わされるアミノ酸配列 [図1〜図2中のアミノ酸配列] と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質である (以下、本発明の蛋白質 (G蛋白質共役型レセプター蛋白質) またはその塩を本発明の蛋白質と略記する場合がある)。

本発明の蛋白質 (G蛋白質共役型レセプター蛋白質) は、例えば、ヒトや哺乳動物 (例えば、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど) のあらゆる細胞 (例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、肝臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞 (例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など) や血球系の細胞 (例えば、MEL, M1, CT LL-2, HT-2, WEHI-3, HL-60, JOSK-1, K562, ML-1, MOLT-3, MOLT-4, MOLT-10, CCRF-CEM, TALL-1, Jurkat, CCRT-HSB-2, KE-37, SKW-3, HUT-78, HUT-102, H9, U937, THP-1, HEL, JK-1, CMK, KO-812, MEG-01など)、またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位 (例、嗅球、脳頭核、大脳

基底球、海馬、視床下部、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳染、黒質)、腎臓、下垂体、胃、脾臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管 (例、大腸、小腸)、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、末梢血球、前立腺、睾丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など (特に、脳や脳の各部位) に由来する蛋白質であつてもよく、また合成蛋白質であつてもよい。

配列番号: 1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号: 1で表わされるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

本発明の配列番号: 1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質としては、例えば、配列番号: 1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号: 1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが好ましい。

実質的に同質の活性としては、例えば、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性が同等 (例、約0.5〜2倍) であることが好ましいが、これらの活性の程度や蛋白質の分子量などの量的要素は異なつていてもよい。

リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性の測定は、自他公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、後述するリガンドの決定方法やスクリーニング方法に従つて測定することができる。

また、本発明の蛋白質としては、①配列番号: 1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上 (好ましくは、1〜30個程度、より好ましくは1〜10個程度、さらに好ましくは数個 (1または2個)) のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号: 1で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上 (好ましくは、1〜30個程度、より好ましくは1〜10個程度、さらに好ましくは数個 (1または2個)) のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号:

11

1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1〜30個程度、より好ましくは1〜10個程度、さらに好ましくは数個(1または2個))のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質なども用いられる。

5 本明細書における蛋白質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端(アミノ末端)、右端がC末端(カルボキシル末端)である。配列番号:1で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質をはじめとする本発明の蛋白質は、C末端が通常カルボキシル基(−COOH)またはカルボキシレート(−COO<sup>−</sup>)であるが、C末端がアミド(−CONH<sub>2</sub>)またはエステル(−COOR)であってもよい。

10 ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチルなどのC<sub>1-6</sub>アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC<sub>3-6</sub>シクロアルキル基、例えば、フェニル、 $\alpha$ -ナフチルなどのC<sub>6-12</sub>アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル-C<sub>1-2</sub>アルキル基もしくは $\alpha$ -ナフチルメチルなどの $\alpha$ -ナフチル-C<sub>1-2</sub>アルキル基などのC<sub>7-14</sub>アルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるジハロイルオキシメチル基などが用いられる。

20 本発明の蛋白質がC末端以外にカルボキシル基(またはカルボキシレート)を有している場合、カルボキシル基がアミドまたはエステル化されているものも本発明の蛋白質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

25 さらに、本発明の蛋白質には、上記した蛋白質において、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基などのC<sub>2-6</sub>アルカノイル基などのC<sub>1-6</sub>アシル基など)で保護されているもの、N末端が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基(例えば、−OH、−SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など)が適当な保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基などのC<sub>2-6</sub>アルカノイル基などのC<sub>1-6</sub>アシル基など)で保

12

護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。

5 本発明の蛋白質の具体例としては、例えば、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列を含有するヒト由来(より好ましくはヒト脳由来)の蛋白質などがあげられる。

10 本発明の蛋白質の部分ペプチド(以下、部分ペプチドと略記する場合がある)としては、前記した本発明の蛋白質の部分ペプチドであれば何れのものであってもよいが、例えば、本発明の蛋白質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位であって、レセプター結合活性を有するものなどが用いられる。

15 具体的には、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列を有する蛋白質の部分ペプチドとしては、(図3)で示される疎水性プロット解析において細胞外領域(親水性(hydrophilic)部位)であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性(hydrophobic)部位を一部に含むペプチドも同様に用いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。本発明の部分ペプチドのアミノ酸の数は、前記した本発明の蛋白質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、より好ましくは100個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが好ましい。

20 実質的に同一のアミノ酸配列とは、これらアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を示す。ここで、「実質的に同質の活性」とは、前記と同意義を示す。「実質的に同質の活性」の測定は前記と同様に行なうことができる。

25 また、本発明の部分ペプチドは、上記アミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1〜10個程度、さらに好ましくは数個(1または2個))のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上(好ましくは、1〜20個程度、より好ましくは1〜10個程度、さらに好ましくは数個(1または2個))のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列中の1または

2個以上（好ましくは、1〜10個程度、より好ましくは1〜5個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

また、本発明の部分ペプチドはC末端が通常カルボキシ基（-COOH）またはカルボキシレート（-COO<sup>-</sup>）であるが、前記した本発明の蛋白質のごとく、C末端がアミド（-CONH<sub>2</sub>）またはエステル（-COOR）であってもよい。

さらに、本発明の部分ペプチドには、前記した本発明の蛋白質と同様に、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したGlnがピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

また、本発明の部分ペプチドはC末端が通常カルボキシ基（-COOH）またはカルボキシレート（-COO<sup>-</sup>）であるが、前記した本発明の蛋白質のごとく、C末端がアミド（-CONH<sub>2</sub>）またはエステル（-COOR）であってもよい。

本発明の蛋白質またはその部分ペプチドの塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明の蛋白質またはその塩は、前述したヒトや哺乳動物の細胞または組織から自体公知の蛋白質の精製方法によって製造することもできるし、後述する本発明の蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述の蛋白質合成法またはこれに準じて製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織

または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることで精製分離することができる。

本発明の蛋白質、その部分ペプチドもしくはそれらの塩またはそれらのアミド体の合成には、通常市販の蛋白質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAW樹脂、4-ヒドロキシメチルフルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-（2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル）フェノキシ樹脂、4-（2',4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル）フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 $\alpha$ -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とする蛋白質の配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂から蛋白質を切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的の蛋白質またはそれらのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、蛋白質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt、HONt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOR（エステルあるいはHOBt）エステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、蛋白質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N,N'-ジメチルホルムアミド、N,N'-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化

15

炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ビリジン、ジオキサソ、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度は蛋白質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃～50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することができる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、ターシャリーベンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

カルボキシ基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ターシャリーブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクタチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、ターシャリーブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に通ずる基としては、例えば、アセチル基などの低級アルカノイル基、ペンノイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられ

16

る。また、エーテル化に通ずる基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、1-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl<sub>2</sub>-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、ターシャリーブチルなどが用いられる。

5 ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、BuM、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

原料のカルボキシ基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル（アルコール（例えば、ベンタクロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステル）などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

15 保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ジペリジン、ジペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-20℃～40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリブトフアンのイソブチル保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

蛋白質のアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシ基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド(蛋白質)鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の $\alpha$ -アミノ基の保護基のみを除いた蛋白質とC末端のカルボキシ基の保護基のみを除いた蛋白質とを製造し、この両蛋白質を上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護蛋白質を精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗蛋白質を得ることができる。この粗蛋白質は既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望の蛋白質のアミド体を得ることができる。

蛋白質のエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシ基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、蛋白質のアミド体と同様に、所望の蛋白質のエステル体を得ることができる。

本発明の蛋白質の部分ペプチドまたはその塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明の蛋白質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明の蛋白質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

- ①M. Bodanszky および M. A. Ondetti, ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)
- ②Schroeder および Luebkke, ザ ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

- ③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)
- ④矢島治明 および榎原俊平、生化学実験講座 1、蛋白質の化学IV, 205, (1977年)

⑤矢島治明監修、統医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の精製法、たとえば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製分離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができる。逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。本発明の蛋白質をコードするDNAとしては、前述した本発明の蛋白質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってよい。また、前記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する)によって増幅することもできる。

具体的には、本発明の蛋白質をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：2で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを有し、本発明の蛋白質と実質的に同質の活性(例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など)を有する蛋白質をコードするDNAであれば何れのもでもよい。

配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、例えば、配列番号：2で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有

するDNAなどが用いられる。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約1.9~4.0 mM、好ましくは約1.9~2.0 mMで、温度が約5.0~7.0℃、好ましくは約6.0~6.5℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約1.9 mMで温度が約6.5℃の場合が最も好ましい。

より具体的には、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNAがあげられる。

15 本発明の蛋白質をコードする塩基配列を含有する、または該塩基配列と相補的な塩基配列の一部を含有してなるヌクレオチド（オリゴヌクレオチド）とは本発明の蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNAを包含するだけではなく、RNAをも包含する意味で用いられる。

本発明に従えば、本発明の蛋白質遺伝子の複製又は発現を阻害することのできるアンチセンス・（オリゴ）ヌクレオチド（核酸）を、クロン化したあるいは決定された蛋白質をコードする塩基配列の塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。そうした（オリゴ）ヌクレオチド（核酸）は、G蛋白質共役型蛋白質遺伝子のRNAとハイブリダイズすることができ、該RNAの合成又は機能を阻害することができるか、あるいはG蛋白質共役型蛋白質関連RNAとの相互作用を介してG蛋白質共役型蛋白質遺伝子の発現を調節・制御することができる。G蛋白質共役型蛋白質関連RNAの選択された配列に相補的な（オリゴ）ヌクレオチド、及びG蛋白質共役型蛋白質関連RNAと特異的にハイブリダイズすることができる（オリゴ）ヌクレオチドは、体内及び体外でG蛋

白質共役型蛋白質遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気の診断又は治療に有用である。

用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列又は核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列又は核酸又はその相補体から誘導される指令にあるベンチドクレオチド（核酸）の配列又はその相補体から誘導される指令にあるベンチド（蛋白質）のアミノ酸を通常指している。G蛋白質共役型蛋白質遺伝子の5'端ヘアピンループ、5'端6-バーンスペア・リビート、5'端非翻訳領域、ポリベンチド翻訳開始コドン、蛋白質コード領域、ORF翻訳開始コドン、3'端非翻訳領域、3'端ポリントローム領域、及び3'端ヘアピンループは好ましい対象領域として選択しうるが、G蛋白質共役型蛋白質遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的な（オリゴ）ヌクレオチドとの関係は、対象物とハイブリダイズすることができる（オリゴ）ヌクレオチドとの関係は、「アッセイ」であるといふことができる。アッセイ・（オリゴ）ヌクレオチドは、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリデオキシヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリデオキシヌクレオチド、アリン又はピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販の蛋白質核酸及び合成配列特異的な核酸ポリマー）又は特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリナグや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、2本鎖DNA、1本鎖DNA、2本鎖RNA、1本鎖RNA、さらにDNA：RNAハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド又は非修飾オリゴヌクレオチド、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キヤプアの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを標識物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電

結合（例えば、メチルホルマホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合又は硫黄含有結合（例えば、ホスホチオエート、ホスホジチオエートなど）を持つもの、例えば蛋白質（ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシシン、抗体、シグナルペプチド、ポリマー（例えば、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレント化合物（例えば、アクリジン、プロラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、 $\alpha$ アノマー型の核糖など）であつてもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」及び「核糖」とは、プリン及びピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素型塩基をもつようなものを含んでいてよい。こうした修飾物は、メチル化されたプリン及びピリミジン、アシル化されたプリン及びピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであつてもよい。修飾されたヌクレオチド及び修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてもよく、例えば1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪酸基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

本発明のアンチセンス核糖は、RNA、DNA、あるいは修飾された核糖である。修飾された核糖の具体例としては核糖の硫黄糖導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドの分解に抵抗性のもが挙げられるが、それに限定されるものではない。本発明のアンチセンス核糖は次のような方針で好ましく設計されうる。すなわち、細胞内のアンチセンス核糖をより安定なものにする、アンチセンス核糖の細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンス核糖の毒性をより小さなものにする。

こうして修飾は当該分野で数多く知られており、例えば J. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp. 247, 1992; Vol. 8, pp. 395, 1992; S. T. Crooke et al., ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993 などに

開示がある。

本発明のアンチセンス核糖は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していて良く、リボソーム、ミクロソームのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン性、細胞膜との相互作用を高めたり、核糖の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホスホリッピド、コレステロールなど）といった粗水性のもが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、コレステリルクロロホルムエート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核糖の3'末端あるいは5'端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができる。その他の基としては、核糖の3'末端あるいは5'端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNaseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水

性基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

アンチセンス核糖の阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいは蛋白質の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べるができる。該核糖其れ自体公知の各種の方法で細胞に適用できる。

本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであつてもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであつてもよい。また、前記した細胞・組織よりmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、RT-PCR法と略称する）



23

によって増幅することもできる。

具体的には、本発明の部分ベクタをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または②配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを有し、本発明の蛋白質ベクタと実質的に同質の活性（例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有する蛋白質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

10 配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、例えば、配列番号：2で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上、なかでも好ましくは約98%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

15 本発明の蛋白質またはその部分ベクタ（以下、本発明の蛋白質と略記する）を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明の蛋白質の部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明の蛋白質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）  
20 2nd (L. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

25 DNAの塩基配列の変換は、PCRや公知のキット、例えば、Mutan<sup>TM</sup>-super Express Km（宝酒造（株））、Mutan<sup>TM</sup>-K（宝酒造（株））等を用いて、ODN-LA PCR法、Gapped duplex法やKunkel法等の自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローニングされた蛋白質をコードするDNAは目的によりそのまま、または

24

所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有しているもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

5 本発明の蛋白質の発現ベクターは、例えば、（イ）本発明の蛋白質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、（ロ）該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

10 ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13）、枯草菌由来のプラスミド（例、pUB110、pTP5、pC194）、酵母由来プラスミド（例、pSH19、pSH15）、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ククニニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRC、CMV、pRC'RSV、pCDNA1'Neoなどが用いられる。

15 本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SRαプロモーター、SV40プロモーター、HIV-LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。

20 これらのうち、CMVプロモーター、SRαプロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λP<sub>L</sub>プロモーター、lprプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロ

モーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40ori）と略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfr）と略称する場合がある）遺伝子（メソトレキセート（MTX）耐性）、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp<sup>r</sup>と略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neo<sup>r</sup>と略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。特に、CHO（dhfr<sup>-</sup>）細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明の蛋白質のN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 $\alpha$ -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF $\alpha$ ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インジュリン・シグナル配列、 $\alpha$ -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明の蛋白質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）K12・DH1（プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユースエスエー（Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.）、60巻、160（1968））、JM103（ヌクレック・アシーズ・リサーチ、（Nucleic Acids Research）、9巻、309（1981））、JA221（ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー（Journal of Molecular

Biology）、120巻、517（1978））、HB101（ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー、41巻、459（1969））、C600（ジェネティクス（Genetics）、39巻、440（1954））などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サチルス（*Bacillus subtilis*）MI114（ジーン、24巻、255（1983））、207-21（ジャーナル・オブ・バイオケミストリー（Journal of Biochemistry）、95巻、87（1984））などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）AH22、AH22R<sup>-</sup>、NA87-11A、DKD-5D、20B-12、シゾサッカロマイセス・ポンベ（*Schizosaccharomyces pombe*）NCYC1913、NCYC2036、ピキア・バストリス（*Pichia pastoris*）などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞（*Spodoptera frugiperda* cell；Sf細胞）、*Trichoplusia ni*の中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh Five<sup>TM</sup>細胞、*Manestra brassicae*由来の細胞または*Estigmene acrea*由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞（*Bombyx mori* N；BmN細胞）などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞（ATCC CRL1711）、Sf21細胞（以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィボ（*In Vivo*）、13、213-217、（1977））などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる（前出ら、ネイチャー（*Nature*）、315巻、592（1985））。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7、Vero、チャイニーズハムスター細胞CHO（以下、CHO細胞と略記）、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO（以下、CHO（dhfr<sup>-</sup>）細胞と略記）、マウスL細胞、マウスAT-20、マウスミエローマ細胞、ラットGH3、ヒトFL細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシージングズ・オブ・

- ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110(1972)やジーン (Gene), 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なうことができる。バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モスキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティクス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。

- 5 酵母を形質転換するには、例えば、メッソズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 194巻, 182-187(1991)、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929(1978)などに記載の方法に従って行なうことができる。

- 10 昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオテクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55(1988)などに記載の方法に従って行なうことができる。

- 15 動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8 新 細胞工学実験プロトコール, 263-267(1995) (秀和社発行)、サイロロジー (Virolgy), 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行なうことができる。

- 20 このようにして、G蛋白質共役型蛋白質をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体が得られる。

- 宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含ませられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、シロ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチーチ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母、ビタミン類、生長促進

- 因子などを添加してもよい。培地のpHは約5〜8が望ましい。エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地 (ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モスキュラー・ジェネティクス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972) が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3β-インドリル アクリル酸のような薬剤を加えることができる。

- 5 宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15〜43℃で約3〜24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

- 10 宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30〜40℃で約6〜24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

- 15 宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バーンホルダー (Burnholder) 最小培地 [Boslian, K. L. ら, 「プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505(1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら, 「プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330(1984)] が挙げられる。培地のpHは約5〜8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃〜35℃で約24〜72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

- 20 宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T. C. C., ネイチヤー (Naure), 195, 788(1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適量加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2〜6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3〜5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

- 宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約

5 5～20%の胎児血清を含むMEM培地 (Science), 122巻, 501(1952), MEM培地 (Virology), 8巻, 39  
6(1959), RPMI 1640培地 (ジャーナル・オブ・アメリカン・  
メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical  
Association) 199巻, 519(1967)), 199培地 (プロシーディング・  
5 オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding  
of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(1950))な  
どが用いられる。pHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30℃～  
40℃で約15～60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

10 以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明のG  
蛋白質共役型蛋白質を生成せしめることができる。

上記培養物から本発明の蛋白質を分離精製するには、例えば、下記の方法に  
より行なうことができる。

15 本発明の蛋白質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、  
公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、  
リゾチームおよびノーマルまたは凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊した  
のち、遠心分離する過により蛋白質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられ  
る。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-  
100<sup>TM</sup>などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中に蛋白質が分泌さ  
20 れる場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清と  
を分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれる蛋白質の精  
製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。こ  
れらの公知の分離・精製法としては、塩析や溶媒沈殿法などの溶解度を利用す  
る方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミ  
ドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロ  
マトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラ  
フィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィー

などの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用  
する方法などが用いられる。

かくして得られる蛋白質が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法ある  
いはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場  
5 合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩  
に変換することができる。

なお、組換え体が産生する蛋白質を、精製前または精製後に適当な蛋白修飾  
酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的  
に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモ  
10 トリプシン、アルギニンエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシ  
ダーゼなどが用いられる。

かくして生成する本発明の蛋白質またはその塩の活性は、標識したリガンド  
との結合実験および特異抗体を用いたエンザイムノアッセイなどにより測  
定することができる。

15 本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体は、本発  
明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩を認識し得る抗体であれば、  
ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩 (以下、本発明の蛋白  
質等と略記する) に対する抗体は、本発明の蛋白質等を抗原として用い、自体  
公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

20 [モノクローナル抗体の作製]

(a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明の蛋白質等は、哺乳動物に対して投与により抗体産生が可能な部位に  
それ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能  
25 を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバント  
を投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行な  
われる。用いられる哺乳動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモ  
ット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギが挙げられるが、マウスおよびラットが

好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、例えば、マウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化した本発明の蛋白質等と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、クーラーとミルスタインの方法（ネイチャー（Nature）、256巻、495頁（1975年））に従い実施することができ、融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）やセンダイウイルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0などが挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1：1～20：1程度であり、PEG（好ましくは、PEG1000～PEG6000）が10～80％程度の濃度で添加され、約20～40℃、好ましくは約30～37℃で約1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

モノクローナル抗体産生ハイブリドマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、本発明の蛋白質等抗原を直接あるいは抗体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはフロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはフロテインAを吸着させた固相にハイブリドマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識した本発明の蛋白質等を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って

行なうことができるが、通常はHAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地などで行なうことができる。選別および清種用培地としては、ハイブリドマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い、例えば、1～20％、好ましくは10～20％の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10％の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））またはハイブリドマ培養用無血清培地（SFM-101、日本製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5％炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

#### (b) モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法（例、塩析法、アルコール沈澱法、等電点沈澱法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相またはフロテインAあるいはフロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法）に従って行なうことができる。

#### （ポリクローナル抗体の作製）

本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法にしたがって製造することができる。例えば、免疫抗原（本発明の蛋白質等抗原）とキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に哺乳動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明の蛋白質等に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造できる。

哺乳動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率的でできれば、どのようなものをどの様な比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブ

ミン、ウシサイゾグロブリン、キーホール・リンベット・ヘモシアニン等を重  
 量比でハブテン1に対し、約0.1〜2.0、好ましくは約1〜5の割合でカプル  
 させる方法が用いられる。

また、ハブテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いること  
 ができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、  
 チナール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるい  
 は担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、  
 完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよ  
 い。投与は、通常約2〜6週毎に1回ずつ、計約3〜10回程度行なうことが  
 できる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された哺乳動物の血液、腹水など、  
 好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の血清中の抗体価の測定と  
 同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクロー  
 ナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうこと  
 ができる。

本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、およびそれらをコー  
 ドするDNAは、①本発明の蛋白質に対するリガンドの決定方法、②抗体およ  
 び抗血清の入手、③組換え型蛋白質の発現系の構築、④同発現系を用いたレセ  
 プター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、⑤構造的  
 に類似したリガンド・レセプターとの比較にもとづいたドッキングデザインの実  
 施、⑥遺伝子診断におけるプローブやPCRプライマーを作成するための試薬、  
 ⑦トランスジェニック動物の作製または⑧遺伝子予防・治療等の医薬などと  
 して用いることができる。

特に、本発明の組換え型蛋白質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系  
 を用いることによって、ヒトや哺乳動物に特異的なG蛋白質共役型レセプター

に対するリガンドの結合性を変化させる化合物（例、アゴニスト、アンタゴニ  
 ストなど）をスクリーニングすることができる。該アゴニストまたはアンタゴニ  
 ストを各種疾病の予防・治療剤などとして使用することができる。

本発明の蛋白質、部分ペプチドまたはそれらの塩（以下、本発明の蛋白質等  
 と略記する場合がある）、本発明の蛋白質またはその部分ペプチドをコードす  
 るDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）および本発明の蛋白  
 質等に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）の用途につい  
 て、以下に具体的に説明する。

(1) 本発明の蛋白質に対するリガンド（アゴニスト）の決定方法

本発明の蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩  
 は、本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンド（アゴニスト）を探索し、  
 または決定するための試薬として有用である。

すなわち、本発明は、本発明の蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペ  
 プチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする本発明  
 の蛋白質に対するリガンドの決定方法を提供する。

試験化合物としては、公知のリガンド（例えば、アングiotensin、ボソペ  
 ジン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニ  
 ン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトリ  
 ン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレナメジュリ  
 ン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP  
 （バソアクチーブインテグスチナルアンダードリレイテッドポリペプチ  
 ド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、C  
 GRP（カルシトニンジーンリレーテッドペプチド）、ロイコトリエン、パ  
 ンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロノボキシン、アデニン、アド  
 レナリン、 $\alpha$ および $\beta$ -ケモカイン（chemokine）（例えば、IL-8、GRO  
 $\alpha$ 、GRO $\beta$ 、GRO $\gamma$ 、NAP 2、ENA 78、FF4、IP10、G  
 CP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 $\alpha$ 、M  
 IP-1 $\beta$ 、RANTESなど）、エンドセリン、エンテログASTリン、ヒス

35

タミン、ニユーロテンジン、T R H、バンクレアティックホリペプチドまたはガラニンなどがあげられ、またその他に、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウシ、ヒツジ、サルなど）の組織抽出物、細胞培養上清などが用いられる。例えば、該組織抽出物、細胞培養上清などを本発明の蛋白質に添加し、細胞刺激活性などを測定しながら分離し、最終的に単一のリガンドを得ることができる。

具体的には、本発明のリガンド決定方法は、本発明の蛋白質、その部分ペプチドもしくはそれらの塩を用いるか、または組換え型蛋白質の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、本発明の蛋白質に結合して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内  $Ca^{2+}$  遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos 活性化、pH の低下などを促進する活性または抑制する活性）を有する化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩を決定する方法である。

本発明のリガンド決定方法においては、本発明の蛋白質またはその部分ペプチドと試験化合物とを接触させた場合の、例えば、該蛋白質または該部分ペプチドに対する試験化合物の結台量や、細胞刺激活性などを測定することを特徴とする。

より具体的には、本発明は、①標識した試験化合物を、本発明の蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合における、標識した試験化合物の該蛋白質もしくはその塩、または該部分ペプチドもしくはその塩に対する結台量を測定することを特徴とする本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法。

②標識した試験化合物を、本発明の蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜面に接触させた場合における、標識した試験化合物の該細胞または該膜面に対する結台量を測定することを特徴とする本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法。

36

③標識した試験化合物を、本発明の蛋白質をコードする DNA を含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した蛋白質に接触させた場合における、標識した試験化合物の該蛋白質またはその塩に対する結台量を測定することを特徴とする本発明の蛋白質に対するリガンドの決定方法。

④試験化合物を、本発明の蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、蛋白質を介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内  $Ca^{2+}$  遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とする本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、および

⑤試験化合物を、本発明の蛋白質をコードする DNA を含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した蛋白質に接触させた場合における、蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内  $Ca^{2+}$  遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とする本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法を提供する。

特に、上記①～③の試験を行ない、試験化合物が本発明の蛋白質に結合することを確認した後に、上記④～⑤の試験を行なうことが好ましい。

まず、リガンド決定方法に用いる蛋白質としては、前記した本発明の蛋白質または本発明の部分ペプチドを含有するものであれば何れのものであってもよいが、動物細胞を用いて大量発現させた蛋白質が適している。

本発明の蛋白質を製造するには、前述の発現方法が用いられるが、該蛋白質をコードする DNA を哺乳動物細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことが好ましい。目的とする蛋白質部分をコードする DNA 断片には、通常、相補 DNA が用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、

遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。本発明の蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス(nuclear polyhedrosis virus; NPV)のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SRAプロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献(Nambhi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 267巻、19555~19559頁、1992年)に記載の方法に従って行うことができる。

したがって、本発明のリガンド決定方法において、本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩を含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製した蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩であってよいし、該蛋白質を含有する細胞またはその細胞膜画分を用いてもよい。

本発明のリガンド決定方法において、本発明の蛋白質を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行うことができる。

本発明の蛋白質を含有する細胞としては、本発明の蛋白質を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが用いられる。

細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロロン(Kinematica社製)による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の画分には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速(500

rpm~3000rpm)で短時間(通常、約1分~10分)遠心し、上清をさらに高速(15000rpm~30000rpm)で通常30分~2時間遠心し、得られる沈殿を膜画分とする。該膜画分中には、発現した蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

該蛋白質を含有する細胞やその膜画分中の蛋白質の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^6$ 分子であるのが好しく、 $10^6 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性(比活性)が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンドを決定する前記の①~③の方法を実施するためには、適当な蛋白質画分と、標識した試験化合物が必要である。

蛋白質画分としては、天然型のレセプター蛋白質画分が、またはそれと同等の活性を有する組換え型レセプター画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。

標識した試験化合物としては、 $[^3H]$ 、 $[^{125}I]$ 、 $[^{14}C]$ 、 $[^{35}S]$ などで標識したアンギオテンジン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、ブリン、バゾプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP(バソアクレティン)、インデスチナル、アンンド、リイテッド、ポリペプチド、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、GRP(カルシトニンジーン、リレー、リレー、リレー)、ロイコトリエン、バンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 $\alpha$ および $\beta$ -ケモカイン(chemokine)(例えば、IL-8、GRO $\alpha$ 、GRO $\beta$ 、GRO $\gamma$ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTESなど)。



39

エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンジン、TRH、バンクレアティックポリペプチド、ガラニンなどが好適である。

具体的には、本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法を行うには、まず本発明の蛋白質を含有する細胞または細胞の膜画分を、決定方法に適したバッファーに懸濁することによりセプター標品を調製する。バッファーには、 $\text{pH} 4 \sim 10$ （望ましくは $\text{pH} 6 \sim 8$ ）のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドと本発明の蛋白質との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80<sup>TM</sup>（花王-アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤やウシ血清アルブミンやセラチンなどの各種蛋白質をバッファーに加えることもできる。さらに、フロテアゼによるリセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMSE、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ベスタチンなどのプロテアゼ阻害剤を添加することできる。0.01ml $\sim$ 10mlの該リセプター溶液に、一定量（5000cpm $\sim$ 500000cpm）の $^3\text{H}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{35}\text{S}$ などで標識した試験化合物を共存させる。非特異的結合量（NSB）を知るために大過剰の未標識の試験化合物を加えた反応チューブも用意する。反応は約0℃から50℃、望ましくは約4℃から37℃で、約20分から24時間、望ましくは約30分から3時間行なう。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターあるいはγ-カウンターで計測する。全結合量（B）から非特異的結合量（NSB）を引いたカウント（B-NSB）が0cpmを超える試験化合物を本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンド（アゴニスト）として選択することができる。

25 本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンドを決定する前記の④～⑤の方法を実施するためには、該蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質の

40

リン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、本発明の蛋白質を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。リガンド決定を行なうにあたっては前もって新鮮な増地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

15 本発明の蛋白質またはその塩に結合するリガンド決定用キットは、本発明の蛋白質もしくはその塩、本発明の部分ペプチドもしくはその塩、本発明の蛋白質を含有する細胞、または本発明の蛋白質を含有する細胞の膜画分などを含有するものである。

本発明のリガンド決定用キットの例としては、次のものが挙げられる。

#### 1. リガンド決定用試薬

##### ①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

20 Hanks' Balanced Salt Solution（ギブコ社製）に、0.05%のウシ血清アルブミン（シグマ社製）を加えたもの。

孔径0.45μmのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製してもよい。

##### ②G蛋白質共役型セプター-蛋白質標品

25 本発明の蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに5×10<sup>5</sup>個/穴で継代し、37℃、5%CO<sub>2</sub>、95%airで2日間培養したもの。

##### ③標識試験化合物

市販の $^3\text{H}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{35}\text{S}$ などで標識した化合物。

または適当な方法で標識化したもの

水溶液の状態のものゝを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1  $\mu$ Mに希釈する。水に難溶性を示す試験化合物については、ジメチルホルムアミド、DMSO、メタノール等に溶解する。

#### 5 ④非標識試験化合物

標識化合物と同じものを100~1000倍濃い濃度に調製する。

#### 2. 測定法

①12穴組織培養用プレートにて培養した本発明の蛋白質発現CHO細胞を、

測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490  $\mu$ lの測定用緩衝液を各穴に加える。

②標識試験化合物を5  $\mu$ l加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知らずには非標識試験化合物を5  $\mu$ l加えておく。

③反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識試験化合物を0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA（和光純薬製）と混合する。

④液体シンチレーションカウンタ（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定する。

本発明の蛋白質またはその塩に結合することができるリガンドとしては、例えば、脳、下垂体、腎臓などに特異的に存在する物質などが挙げられ、具体的には、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレラ毒素、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、ブリン、バゾプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクテイク）インテグリン、アン、ド、リレイテッド、ポリペプチド、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、グラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレインディッドペプチド）、ロイコトリエン、バンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデニン、アドレナリン、 $\alpha$ および $\beta$ -ケモカイン（chemokine）

（例えば、IL-8、GRO $\alpha$ 、GRO $\beta$ 、GRO $\gamma$ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTESなど）、エンドセリン、エンテロカスリン、ヒスタミン、ニューロテニン、TRH、バンクレアディックポリペプチド、ガラニンなどが用いられる。

（2）本発明の蛋白質欠乏症の予防・治療剤

上記（1）の方法において、本発明の蛋白質に対するリガンドが明らかになれば、該リガンドが有する作用に応じて、①本発明の蛋白質または②該蛋白質をコードするDNAを、本発明の蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および/または治療剤などの医薬として使用することができる。

例えば、生体内において本発明の蛋白質が減少しているためにリガンドの生理作用が期待できない（該蛋白質の欠乏症）患者がいる場合に、①本発明の蛋白質を該患者に投与し該蛋白質の量を補充したり、②（イ）本発明の蛋白質をコードするDNAを該患者に投与し発現させることによって、あるいは（ロ）対象となる細胞に本発明の蛋白質をコードするDNAを導入し発現させた後に、該細胞を該患者に移植することなどによって、患者の体内における蛋白質の量を増加させ、リガンドの作用を充分に発現させることができる。したがって、本発明の蛋白質をコードするDNAは、安全で低毒性な本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および/または治療剤などの医薬として有用である。

本発明の蛋白質または本発明のDNAは中枢疾患（例えばアルツハイマー病・痴呆・摂食障害（拒食症）・てんかんなど）、ホルモン系の疾患（例えば、糖尿病、弛緩出血、胎盤娩出前後、子宮復古不全、帝王切開術、人工妊娠中絶、乳汁うっ滞など）、肝/胆/膵/内分泌疾患（例えば糖尿病・摂食障害など）、炎症性疾患（アレルギー・喘息・リュウマチなど）、循環器疾患（例えば高血圧症・心肥大・狭心症・動脈硬化等）の予防および/または治療に有用である。

本発明の蛋白質を上記予防・治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

43

一方、本発明の蛋白質をコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）を上記予防・治療剤として使用する場合は、本発明のDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエータッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。本発明のDNAは、そのまま、あるいは採取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やハイブリッドカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

例えば、①本発明の蛋白質または②該蛋白質をコードするDNAは、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクログラズセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、①本発明の蛋白質または②該蛋白質をコードするDNAを生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ペヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トウモロコシ、アラビガムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチエリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-エントール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例え

44

ば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート 80™、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴア油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、上記予防・治療剤は、例えば、リン酸緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩化プロカイジンなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンフルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、マウ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

本発明の蛋白質またはDNAの投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（60 kgとして）の拒食症患者においては、一日につき約0.1 mg～1.0 mgである。非経口的には約1.0～5.0 mg、より好ましくは約1.0～2.0 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常成人（60 kgとして）の拒食症患者においては、一日につき約0.01～3.0 mg程度、好ましくは約0.1～2.0 mg程度、より好ましくは約0.1～1.0 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当りに換算した量を投与することができる。

#### (3) 遺伝子診断剤

本発明のDNAは、プローブとして使用することにより、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、マウ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）における本発明の蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNAまたはm

RNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断として有用である。

本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（ゲノミクス（Genomics）、第5巻、874～879頁（1989年）、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ユエスエー（Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America）、第86巻、2766～2770頁（1989年））などにより実施することができる。

#### （4）本発明の蛋白質に対するリガンドの定量法

本発明の蛋白質等は、リガンドに対して結合性を有しているので、生体内におけるリガンド濃度を感度良く定量することができる。

本発明の定量法は、例えば、競合法と組み合わせることによって用いることができる。すなわち、被検体を本発明の蛋白質等と接触させることによって被検体中のリガンド濃度を測定することができる。具体的には、例えば、以下の①または②などに記載の方法あるいはそれに準じる方法に従って用いることができる。

①入江寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和49年発行）

②入江寛編「統ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和54年発行）

（5）本発明の蛋白質とリガンドとの結合性を变化させる化合物のスクリーニング方法

本発明の蛋白質等を用いるか、または組換え型蛋白質等の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、リガンドと本発明の蛋白質等との結合性を变化させる化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩を効率よくスクリーニングすることができる。

このような化合物には、（イ）G蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激

活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を有する化合物（いわゆる、本発明の蛋白質に対するアゴニスト）、（ロ）該細胞刺激活性を有しない化合物（いわゆる、本発明の蛋白質に対するアンタゴニスト）、（ハ）リガンドと本発明の蛋白質との結合力を増強する化合物、あるいは（ニ）リガンドと本発明の蛋白質との結合力を減少させる化合物などが含まれる（なお、上記（イ）の化合物は、前記したリガンド決定方法によってスクリーニングすることが好ましい）。

すなわち、本発明は、（イ）本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩と、リガンドとを接触させた場合と（ii）本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩と、リガンドおよび試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするリガンドと本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のスクリーニング方法においては、（i）と（ii）の場合における、例えば、該蛋白質等に対するリガンドの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較することを特徴とする。

より具体的には、本発明は、

①標識したリガンドを、本発明の蛋白質等に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明の蛋白質等に接触させた場合における、標識したリガンドの該蛋白質等に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明の蛋白質等との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

②標識したリガンドを、本発明の蛋白質等を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明の蛋白質等を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特

47

徴とするリガンドと本発明の蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

- ③標識したリガンドを、本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した蛋白質等に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明の蛋白質等に接触させた場合における、標識したリガンドの該蛋白質等に対する結合量を測定し、比較することと特徴とするリガンドと本発明の蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

- ④本発明の蛋白質等を活性化する化合物（例えば、本発明の蛋白質等に対するリガンドなど）を本発明の蛋白質等を含有する細胞に接触させた場合と、本発明の蛋白質等を活性化する化合物および試験化合物を本発明の蛋白質等を含有する細胞に接触させた場合における、レセプターを介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、細胞内cAMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明の蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および

- ⑤本発明の蛋白質等を活性化する化合物（例えば、本発明の蛋白質等に対するリガンドなど）を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明の蛋白質等に接触させた場合と、本発明の蛋白質等を活性化する化合物および試験化合物を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明の蛋白質等に接触させた場合における、レセプターを介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）

48

を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明の蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

- 本発明の蛋白質等が得られる以前は、G蛋白質共役型レセプターアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングする場合、まずラットなどのG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含む細胞、組織またはその細胞膜画分を用いて候補化合物を得て（一次スクリーニング）、その後には候補化合物が実際にヒトのG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合を阻害するか否かを確認する試験（二次スクリーニング）が必要であった。細胞、組織または細胞膜画分をそのまま用いれば他のレセプター蛋白質も混在するために、目的とするレセプター蛋白質に対するアゴニストまたはアンタゴニストを実際にスクリーニングすることは困難であった。

- しかしながら、例えば、本発明のヒト由来蛋白質を用いることによって、一次スクリーニングの必要がなくなり、リガンドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物を効率良くスクリーニングすることができる。さらに、スクリーニングされた化合物がアゴニストかアンタゴニストかを簡単に評価することができる。

本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

- まず、本発明のスクリーニング方法に用いる本発明の蛋白質等としては、前記した本発明の蛋白質等を含有するものであれば何れのものであってもよいが、本発明の蛋白質等を含有する哺乳動物の臓器の細胞膜画分が好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組織全体を用いて大量発現させたヒト由来のレセプター蛋白質などが適している。

- 本発明の蛋白質等を製造するには、前述の方法が用いられるが、本発明のDNAを哺乳細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことが好ましい。目的とする蛋白質部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。本発明の蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、



それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキ  
 ュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus; N  
 PV) のポリヘトリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウ  
 イルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒトシヨック  
 プロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなど  
 の下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自  
 体公知の方法で行うことができる。例えば、文献 (Nambí, P. ら、ザ・ジャー  
 ナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 267巻, 19555  
 ~19559頁, 1992年) に記載の方法に従って行なうことができる。

- 10 したがって、本発明のスクリーニング方法において、本発明の蛋白質等を含  
 有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製した蛋白質等であって  
 もよいし、該蛋白質等を含有する細胞を用いてもよく、また該蛋白質等を含有  
 する細胞の膜画分を用いてもよい。

- 15 本発明のスクリーニング方法において、本発明の蛋白質等を含有する細胞を  
 用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよ  
 い、固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行なうことができる。

本発明の蛋白質等を含有する細胞としては、該蛋白質等を発現した宿主細胞  
 をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞  
 などが好ましい。

- 20 細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細  
 胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-  
 Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、フーリングアレンダーやボ  
 リトロン (Klenamatica社製) のよる破碎、超音波による破碎、フレンチプレス  
 などに加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙  
 げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠  
 心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速 (500  
 rpm ~ 3000 rpm) で短時間 (通常、約1分 ~ 10分) 遠心し、上清を  
 さらに高速 (15000 rpm ~ 30000 rpm) で通常30分 ~ 2時間遠

心し、得られる沈殿を膜画分とする。該膜画分中には、発現した蛋白質等と細  
 胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

- 5 該蛋白質等を含有する細胞や膜画分中の該蛋白質の量は、1細胞当たり  
 $10^3 \sim 10^8$  分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$  分子であるのが好適であ  
 る。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性 (比活性) が高  
 くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロ  
 ットで大量の試料を測定できるようになる。

- 10 リガンドと本発明の蛋白質等との結合性を変化させる化合物をスクリーニ  
 グする前記の①~③を実施するためには、例えば、適当な蛋白質画分と、標識  
 したリガンドが必要である。

蛋白質画分としては、天然型のレセプター蛋白質画分か、またはそれと同等  
 の活性を有する組換え型レセプター蛋白質画分などが望ましい。ここで、同等  
 の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。

- 15 標識したリガンドとしては、標識したリガンド、標識したリガンドアナログ  
 化合物などが用いられる。例えば、 $[^3H]$ 、 $[^{125}I]$ 、 $[^{14}C]$ 、 $[^{35}S]$   
 などで標識されたリガンドなどが用いられる。

- 20 具体的には、リガンドと本発明の蛋白質等との結合性を変化させる化合物の  
 スクリーニングを行なうには、まず本発明の蛋白質等を含有する細胞または細  
 胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することにより蛋白  
 質標品を調製する。バッファーには、pH4 ~ 10 (望ましくはpH6 ~ 8)  
 のリン酸バッファー、トリス・塩酸バッファーなどのリガンドと蛋白質との結  
 合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低  
 減させる目的で、CHAPS、Tween-80<sup>TM</sup> (花王・アトラス社)、ジ  
 ギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもで  
 25 きる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的  
 でPMSF、ロイペプチン、E-64 (ペプチド研究所製)、ペプスタチンな  
 どのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01mM ~ 1.0mMの核  
 レセプター溶液に、一定量 (5000c.p.m. ~ 50000c.p.m.) の標識し

たリガンドを添加し、同時に $10^{-4}$ M $\sim 10^{-10}$ Mの試験化合物を共存させる。非特異的結合量 (NSB) を知るために大過剰の未標識のリガンドを加えた反応チューブも用意する。反応は約0℃から50℃、望ましくは約4℃から37℃で、約20分から24時間、望ましくは約30分から3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンタまたはヤーカウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント(B<sub>0</sub>)から非特異的結合量(NSB)を引いたカウント(B<sub>0</sub>-NSB)を100%とした時、特異的結合量(B-NSB)が、例えば、50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

リガンドと本発明の蛋白質等との結合性を变化させる化合物スクリーニングする前記の④～⑤の方法を実施するためには、例えば、蛋白質を介する細胞刺激活性 (例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など) を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。

具体的には、まず、本発明の蛋白質等を含む細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適量なバッファに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質 (例えば、アラキドン酸など) の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適量な蛋白質を発現

した細胞が必要である。本発明の蛋白質等を発現した細胞としては、天然型の本発明の蛋白質等を有する細胞株、前述の組換え型蛋白質等を発現した細胞株などが望ましい。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが用いられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

リガンドと本発明の蛋白質等との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、本発明の蛋白質等、本発明の蛋白質等を含有する細胞、または本発明の蛋白質等を含有する細胞の膜画分を含有するものなどである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

# 1. スクリーニング用試薬

## ①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

15 Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。

孔径0.45μmのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

## ②G蛋白質共役型レセプター標品

20 本発明の蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに $5 \times 10^5$ 個/穴で継代し、37℃、5%CO<sub>2</sub>、95%airで2日間培養したもの。

## ③標識リガンド

25 市販の(<sup>3</sup>H)、(<sup>125</sup>I)、(<sup>14</sup>C)、(<sup>35</sup>S)などで標識したリガンドを溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1μMに希釈する。

## ④リガンド標準液

リガンドを0.1%ウシ血清アルブミン (シグマ社製) を含むPBSで1mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。



## 2. 測定法

① 12穴組織培養用プレートにて培養した本発明の蛋白質発現CHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490 $\mu$ lの測定用緩衝液を各穴に加える。

5 ②  $10^{-3} \sim 10^{-10}$ Mの試験化合物溶液を5 $\mu$ l加えた後、標識リガンドを5 $\mu$ l加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物の代わりに $10^{-3}$ Mのリガンドを5 $\mu$ l加えておく。

10 ③ 反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識リガンドを0.2N NaOH-1% SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーター-A (和光純薬製) と混合する。

④ 液体シンチレーションカウンター (ベックマン社製) を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB) を次の式で求める。

$$PMB = [(B - NSB) / (B_0 - NSB)] \times 100$$

15 PMB : Percent Maximum Binding

B : 検体を加えた時の値

NSB : Non-specific Binding (非特異的結合量)

B<sub>0</sub> : 最大結合量

20 本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、リガンドと本発明の蛋白質等との結合性を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、(イ) G蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激活性 (例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトール

25 三リン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など) を有する化合物 (いわゆる、本発明の蛋白質に対するアゴニスト)、(ロ) 該細胞刺激活性を有しない化合物 (いわゆる、本発明の蛋白質に対するアンタゴニスト)、(ハ) リ

ガンドと本発明のG蛋白質共役型蛋白質との結合力を増強する化合物、あるいは (ニ) リガンドと本発明のG蛋白質共役型蛋白質との結合力を減少させる化合物である。

5 該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

10 本発明の蛋白質等に対するアゴニストは、本発明の蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性と同様の作用を有しているため、該リガンド活性に応じて安全で低毒性な医薬 [例えば、中枢疾患 (例えばアルツハイマー病、痴呆、摂食障害 (拒食症) ・てんかんなど)、ホルモン系の疾患 (例えば、微弱障害、弛緩出血、胎盤娩出前後、子宮復古不全、帝王切開術、人工妊娠中絶、乳汁うっ滞など)、肝/胆/膵/内分泌疾患 (例えば糖尿病・摂食障害など)、炎症性疾患 (アレルギー・喘息・リュウマチなど)、循環器疾患 (例えば高血圧症・心肥大・狭心症・動脈硬化等) の予防および/または治療剤など] として有用である。

15 本発明の蛋白質等に対するアンタゴニストは、本発明の蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性を抑制することができるので、該リガンド活性を抑制する安全で低毒性な医薬 [例えば、ホルモン分泌調節薬、本発明の蛋白質等に対するリガンドの過剰な産生によって惹起される中枢疾患、ホルモン系の疾患、肝/胆/膵/内分泌疾患 (例えば抗肥満薬・摂食過剰など)、炎症性疾患、循環器疾患の予防および/または治療薬など] として有用である。

20 リガンドと本発明の蛋白質との結合力を減少させる化合物は、本発明の蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性を減少させるための安全で低毒性な医薬 [例えば、ホルモン分泌調節薬、本発明の蛋白質等に対するリガンドの過剰な産生によって惹起される中枢疾患、ホルモン系の疾患、肝/胆/膵/内分泌疾患 (例えば抗肥満薬・摂食過剰など)、炎症性疾患、循環器疾患の予防および/または治療薬など] として有用である。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上記の医薬組成物として使用する場合、常套手段に従

って実施することができる。例えば、前記した本発明の蛋白質含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イス、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（60 kgとして）においては、一日につき約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常成人（60 kgとして）においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kgあたりに換算した量を投与することができる。

(6) 本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩の定量

本発明の抗体は、本発明の蛋白質等を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明の蛋白質等の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。すなわち、本発明は、(i) 本発明の抗体と、被検液および標識化蛋白質等とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化蛋白質等の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明の蛋白質等の定量法、

(ii) 被検液と抗体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶性抗体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明の蛋白質等の定量法を提供する。

上記(ii)においては、一方の抗体が本発明の蛋白質等のN端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明の蛋白質等のC端部に反応する抗体であることが好ましい。

本発明の蛋白質等に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明の蛋白質等の測定を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(ab')<sub>2</sub>、Fab'、あるいはFab画分を用いてもよい。本発明の蛋白質等に対する抗体を用いる測定方法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原（例えば、蛋白質）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>Cなどが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、β-ガラクトシダーゼ、β-グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレセイン、ソチニシン、アネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、リンフェリン、リンゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常、蛋白質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、例えば、アガロース、デキストラン、セロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が用いられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液

を反応させ（１次反応）、さらに標識化した本発明のモノクローナル抗体を反応させ（２次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明の蛋白質量を定量することができる。１次反応と２次反応は逆の順序に行なっても、また、同時に行なってもよい時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができ

る。

また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも１種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で２種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

10 本発明のサンドイッチ法による本発明の蛋白質等の測定法においては、１次反応と２次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は本発明の蛋白質等の結合する部位が異なる抗体が好ましく用いられる。即ち、１次反応および２次反応に用いられる抗体は、例えば、２次反応で用いられる抗体が、本発明の蛋白質のＣ末端部を認識する場合、１次反応で用いられる抗体は、好ましくは

15 Ｃ末端部以外、例えばＮ末端部を認識する抗体が用いられる。

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原と（Ｆ）と抗体と結合した標識抗原（Ｂ）とを分離し（Ｂ／Ｆ分離）、Ｂ、Ｆいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、Ｂ／Ｆ分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第２抗体などを用いる被相法、および、第

20 １抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第１抗体は可溶性のものを用い第２抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

25 イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの

相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果、生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

5 これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明の蛋白質またはその塩の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、

10 総説、成書などを参照することができる（例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和５４年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（医学書院、昭和５３年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第２版）（医学書院、昭和５７年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第３版）（医学書院、昭和６２年発行）、「メソックス・イン・エンジモノジー（Methods in ENZYMOLOGY）」Vol. 70 (Immunochemical Techniques (Part A))、同書 Vol. 73 (Immunochemical Techniques (Part B))、同書 Vol. 74 (Immunochemical Techniques (Part C))、同書 Vol. 84 (Immunochemical Techniques (Part D: Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92 (Immunochemical Techniques (Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121 (Immunochemical Techniques (Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックスプレス社発行など参照)。

20 以上のように、本発明の抗体を用いることによって、本発明の蛋白質またはその塩を高感度良く定量することができる。さらに、本発明の抗体を用いて本発明の蛋白質またはその塩を定量することによって、各種疾病の診断をすることができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明の蛋白質等を検出するために使用することができる。また、本発明の蛋白質等を精製

するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明の蛋白質等の検出、被検細胞内における本発明の蛋白質の挙動の分析などのために使用することができる。

(7) 本発明のG蛋白質共役型蛋白質をコードするDNAを有する非ヒト動物の作製

本発明のDNAを用いて、本発明の蛋白質等を発現するトランスジェニック非ヒト動物を作製することができる。非ヒト動物としては、哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）など（以下、動物と略記する）が挙げられるが、特に、マウス、ウサギなどが好適である。

本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させるプロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、ウサギ由来の本発明のDNAを転移させる場合、これと相溶性が高い動物由来の本発明のDNAを動物細胞で発現させる各種プロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトを、例えば、ウサギ受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明の蛋白質等を高産生するDNA転移動物を作出できる。このプロモーターとしては、例えば、ウイルス由来プロモーター、メタロチオネイン等のユビキアスな発現プロモーターも使用しうるが、好ましくは脳で特異的に発現するNGF遺伝子プロモーターやエノラーゼ遺伝子プロモーターなどが用いられる。

受精卵細胞段階における本発明のDNAの転移は、対象動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞においては本発明の蛋白質等が存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞及び体細胞の全てに本発明の蛋白質等を有することを意味する。遺伝子を受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の蛋白質等を有する。

本発明のDNA転移動物は、交配により遺伝子を安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で飼育継代を行うことができる。

さらに、目的DNAを保有する雄雄の動物を交配することにより、導入遺伝子を相同染色体の両方に持つホモザイグート動物を取得し、この雄雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

5 本発明のDNAが転移された動物は、本発明の蛋白質等が発現させられているので、本発明の蛋白質等に対するアブテストまたはアングテストのフリーニング用の動物などとして有用である。

本発明のDNA転移動物を、組織培養のための細胞源として使用することもできる。例えば、本発明のDNA転移マウスの組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、あるいは遺伝子により発現された本発明の蛋白質が存在する組織を分析することにより、本発明の蛋白質等について分析することができる。本発明の蛋白質等を有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、例えば、脳や末梢組織由来のような一般に培養困難な組織からの細胞の機能を研究することができる。また、その細胞を用いることにより、例えば、各種組織の機能を高めるような医薬の選択も可能である。また、高発現細胞株があれば、そこから、本発明の蛋白質等を単離精製することも可能である。

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用語号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に關し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければし体を示すものとする。

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン

61

	RNA	: リボ核酸
	mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
	dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
	dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
5	dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
	dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
	ATP	: アデノシン三リン酸
	EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
	SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
10	Gly	: グリシン
	Ala	: アラニン
	Val	: バリン
	Leu	: ロイシン
	Ile	: イソロイシン
15	Ser	: セリン
	Thr	: スレオニン
	Cys	: システイン
	Met	: メチオニン
	Glu	: グルタミン酸
20	Asp	: アスパラギン酸
	Lys	: リジン
	Arg	: アルギニン
	His	: ヒスチジン
	Phe	: フェニルアラニン
25	Tyr	: チロシン
	Trp	: トリプトファン
	Pro	: プロリン
	Asn	: アスパラギン

62

	Gln	: グルタミン
	pGlu	: ヒドログルタミン酸
	Tos	: p-トルエンスルフォニル
	CHO	: ホルミル
5	Bz1	: ベンジル
	Cl <sub>2</sub> Bz1	: 2, 6-ジクロロベンジル
	Bom	: ベンジルオキシメチル
	Z	: ベンジルオキシカルボニル
	Cl-Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル
10	B <sub>r</sub> -Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
	Boc	: t-ブトキシカルボニル
	DNP	: ジニトロフェノール
	Trt	: トリチル
	Bum	: t-ブトキシメチル
15	Fmoc	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
	HOBT	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
	HOObt	: 3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-1, 2, 3-ベンゾトリアジン
	HONB	: 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシイミド
20	DCC	: N, N'-ジニトロベンジルカルボジイミド
	本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。	
	〔配列番号：1〕	
	本発明のヒト脳由来蛋白質のアミノ酸配列を示す。	
	〔配列番号：2〕	
25	配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするDNAの塩基配列を示す (A Q 27)。	
	〔配列番号：3〕	
	後述の実施例1および実施例2で用いられたプライマー1の塩基配列を示す。	

(配列番号：4)

後述の実施例1および実施例2で用いられたプライマー2の塩基配列を示す。

(配列番号：5)

後述の実施例2で用いられたフォワードプライマーの塩基配列を示す。

(配列番号：6)

後述の実施例2で用いられたリバースプライマーの塩基配列を示す。

(配列番号：7)

後述の実施例2で用いられたプローブの塩基配列を示す。

後述の実施例1で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ /pcDNA3.1-AQ27は、平成11年8月23日から日本国茨城県つくば市東1丁目1-3の通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH) に寄託番号FERM BP-6854として、平成11年8月4日から日本国大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17-85の財団法人・発酵研究所 (IFO) に寄託番号IFO 16304として寄託されている。

以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作法は、モレキュラー・クローニング (Molecular cloning) に記載されている方法に従った。

実施例1 G蛋白質共役型レセプター蛋白質AQ27をコードするcDNAのクローニングと塩基配列の決定

ヒト胎児脳cDNA (CLONTECH社) を鋳型とし、2個のプライマー、プライマー1 (5'-TGT CAG CAT GCA GCC GCT TAA CAT TAC CCC GGA GCA G-3'; 配列番号：3) 及びプライマー2 (5'-GAC TAG TTT AAT GCC CAC TGT CTA AAG GAG AAT TCT C-3'; 配列番号：4) を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は上記cDNAの10分の1量を鋳型として使用し、Advantage2 Polymerase Mix (CLONTECH社) 1/50量、プライマー1及びプライマー2を各0.2 $\mu$ M、dNTPs 200 $\mu$ M、及び酵素に添付

のバッファーを加え、25 $\mu$ lの液量とした。PCR反応は、95 $^{\circ}$ C・1分の後、95 $^{\circ}$ C・30秒、72 $^{\circ}$ C・4分のサイクルを5回、95 $^{\circ}$ C・30秒、70 $^{\circ}$ C・4分のサイクルを5回、95 $^{\circ}$ C・30秒、68 $^{\circ}$ C・30秒、66 $^{\circ}$ C・4分のサイクルを30回繰り返して、最後に68 $^{\circ}$ C・3分の伸長反応を行った。該PCR反応後の反応産物をTAKARAコーニングキット (Invitrogen社) の処方に従いブラスミドベクターpcDNA3.1/V5/His (Invitrogen社) のサブクローニングし、得られたプラスミドをpcDNA3.1-AQ27と命名した。これを大腸菌DH5 $\alpha$ に導入し、cDNAをもつクローンをアンピシリンを含むLB寒天培地中で選別した後、個々のクローンの配列を解析した結果、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNA配列を得た。このcDNAより導き出されるアミノ酸配列を有する蛋白質をAQ27と命名し、この形質転換体は大腸菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ /pcDNA3.1-AQ27と命名した。

実施例2 TaqMan PCR を用いた AQ27 の発現組織分布の解析

まずプライマー及びプローブは Primer Express ver 1.0 (PE バイオシステムズジャパン) を用いてデザインし、フォワードプライマー AQ27taqF (5'-CAATG CTAGG TGTGG TCTGG CT-3' (配列番号：5))、リバースプライマー AQ27taqR (5'-GATCT CAAGT TGTTC CACGT GC-3' (配列番号：6))、プローブ AQ27-515T (5'-TGCA GTCAT GCTAG GATCA CCCAT G-3' (配列番号：7)) を作製した。プローブのリポーター色素は FAM (carboxyfluorescein) を付加した。

スタンダード cDNA は、pcDNA3.1-AQ27を鋳型にしてプライマー 1 (配列番号：3)、プライマー 2 (配列番号：4) を用いて増幅したPCR断片をQIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN (Germany)) にて精製し、 $10^6$  -  $10^4$  コピー/ $\mu$ l に調整して用いた。

各組織の cDNA ソースは Human Tissue cDNA Panel 1 及び Panel 11 (CLONTECH Laboratories, Inc. (CA, USA)) を用いた。

TaqMan PCR の反応は TaqMan Universal PCR Master Mix (PE バイオシステムズ)

65

ムスジヤパン) の試薬を用い、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (PE/バイオシステムズジャパン) にて、添付の説明書に従い反応させた。

結果を図4および表1に示した。AQ27 は心臓、肝臓、精巣に高い発現が見られた。

5 表 1

Tissue	Expression (copies/ $\mu$ l)
brain	39
heart	158
kidney	74
liver	0
lung	1
pancreas	2
placenta	2
skeletal muscle	4
colon	17
ovary	2
leukocyte	25
prostate	32
small intestine	16
spleen	2
testis	50
thymus	6

### 実施例 3 AQ27のMet-Enkephalin-Arg-Phe amideに対する反応

AQ27発現CHO細胞およびmock細胞をサイトセンサー用のカプセルにそれぞれ  $2.7 \times 10^6$  cells/capsule で播種し、一晚培養した後、サイトセンサー (モレキュラーデバイス社) にセットした。Acidification rate が安定した後、Met-Enkephalin-Arg-Phe amide (Bachem社、H-2835) を  $10 \mu$ M の濃度で7分2秒間作用させ、Acidification rate の上昇率を指標に細胞の活性化を測定した。その結果、Met-Enkephalin-Arg-Phe amide はAQ27発現CHO細胞を特異的に活性化し、AQ27に対して特異的に反応することが確認された (図5)。

15

産業上の利用可能性

66

本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、およびそれらをコードするDNAは、①リガンド (アゴニスト) の決定、②抗体および抗血清の入手、③組み替え型蛋白質の発現系の構築、④同発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、⑤構造的に類似したリガンド・レセプターとの比較にもとづいたドラッグデザインの実施、⑥遺伝子診断におけるプローブやPCRプライマーの作成のための試薬、⑦トランスジェニック動物の作製または⑧遺伝子予防・治療等の医薬等として用いることができる。

5

## 請求の範囲

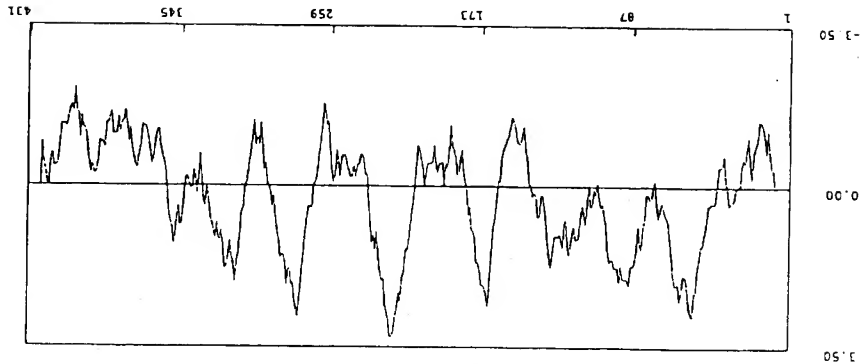
1. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする蛋白質またはその塩。
2. 請求項1記載の蛋白質の部分ペプチドまたはその塩。
3. 請求項1記載の蛋白質をコードするDNAを含有するDNA。
4. 配列番号：2で表される塩基配列を有する請求項3記載のDNA。
5. 請求項3記載のDNAを含有する組換えベクター。
6. 請求項5記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。
7. 請求項6記載の形質転換体を培養し、請求項1記載の蛋白質を生成・蓄積せしめることを特徴とする請求項1記載の蛋白質またはその塩の製造法。
8. 請求項1記載の蛋白質もしくは請求項2記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。
9. 請求項1記載の蛋白質もしくは請求項2記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする請求項1記載の蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法。
10. 請求項1記載の蛋白質もしくは請求項2記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とするリガンドと請求項1記載の蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。
11. 請求項1記載の蛋白質もしくは請求項2記載の部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とするリガンドと請求項1記載の蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニングキット。
12. 請求項10記載のスクリーニング方法または請求項11記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リガンドと請求項1記載の蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩。
13. 請求項10記載のスクリーニング方法または請求項11記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リガンドと請求項1記載の蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬。

14. 請求項3記載のDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

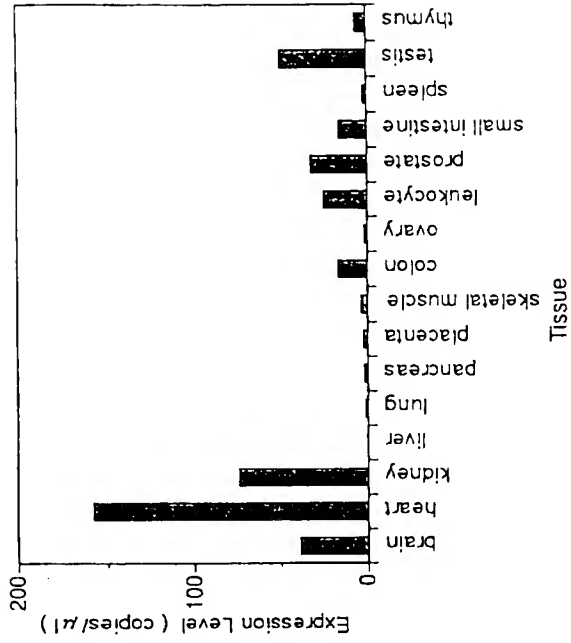




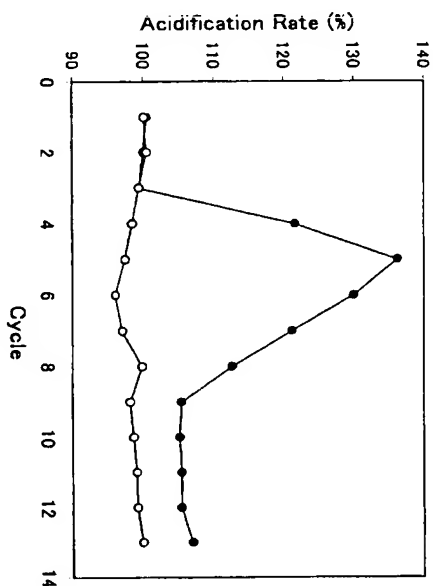
3/5 ☒ 3



4/5 ☒ 4



5/5

☒ 5

1/5

## SEQUENCE LISTINGS

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.  
 <120> Novel G Protein Coupled Receptor Protein and Its Use  
 <130> 2633K00P  
 <150> JP 11-241530  
 <151> 1999-08-27  
 <160> 7  
 <210> 1  
 <211> 431  
 <212> PRT  
 <213> Human  
 <400> 1  
 Met Gln Ala Leu Asn Ile Thr Pro Glu Gln Phe Ser Arg Leu Leu Arg  
 1 5 10 15  
 Asp His Asn Leu Thr Arg Glu Gln Phe Ile Ala Leu Tyr Arg Leu Arg  
 20 25 30  
 Pro Leu Val Tyr Thr Pro Glu Leu Pro Gly Arg Ala Lys Leu Ala Leu  
 35 40 45  
 Val Leu Thr Gly Val Leu Ile Phe Ala Leu Ala Leu Phe Gly Asn Ala  
 50 55 60  
 Leu Val Phe Tyr Val Val Thr Arg Ser Lys Ala Met Arg Thr Val Thr  
 65 70 75 80  
 Asn Ile Phe Ile Cys Ser Leu Ala Leu Ser Asp Leu Leu Ile Thr Phe  
 85 90 95  
 Phe Cys Ile Pro Val Thr Met Leu Gln Asn Ile Ser Asp Asn Trp Leu  
 100 105 110  
 Gly Gly Ala Phe Ile Cys Lys Met Val Pro Phe Val Gln Ser Thr Ala

2/5

115 120 125  
Val Val Thr Glu Ile Leu Thr Met Thr Cys Ile Ala Val Glu Arg His  
130 135 140  
Gln Gly Leu Val His Pro Phe Lys Met Lys Trp Gln Tyr Thr Asn Arg  
145 150 155 160  
Arg Ala Phe Thr Met Leu Gly Val Val Trp Leu Val Ala Val Ile Val  
165 170 175  
Gly Ser Pro Met Trp His Val Gln Gln Leu Glu Ile Lys Tyr Asp Phe  
180 185 190  
Leu Tyr Glu Lys Glu His Ile Cys Cys Leu Glu Glu Trp Thr Ser Pro  
195 200 205  
Val His Gln Lys Ile Tyr Thr Thr Phe Ile Leu Val Ile Leu Phe Leu  
210 215 220  
Leu Pro Leu Met Val Met Leu Ile Leu Tyr Ser Lys Ile Gly Tyr Glu  
225 230 235 240  
Leu Trp Ile Lys Lys Arg Val Gly Asp Gly Ser Val Leu Arg Thr Ile  
245 250 255  
His Gly Lys Glu Met Ser Lys Ile Ala Arg Lys Lys Lys Arg Ala Val  
260 265 270  
Ile Met Met Val Thr Val Val Ala Leu Phe Ala Val Cys Trp Ala Pro  
275 280 285  
Phe His Val Val His Met Met Ile Glu Tyr Ser Asn Phe Glu Lys Glu  
290 295 300  
Tyr Asp Asp Val Thr Ile Lys Met Ile Phe Ala Ile Val Gln Ile Ile  
305 310 315 320  
Gly Phe Ser Asn Ser Ile Cys Asn Pro Ile Val Tyr Ala Phe Met Asn  
325 330 335  
Glu Asn Phe Lys Lys Asn Val Leu Ser Ala Val Cys Tyr Cys Ile Val

3/5

340 345 350  
Asn Lys Thr Phe Ser Pro Ala Gln Arg His Gly Asn Ser Gly Ile Thr  
355 360 365  
Met Met Arg Lys Lys Ala Lys Phe Ser Leu Arg Glu Asn Pro Val Glu  
370 375 380  
Glu Thr Lys Gly Glu Ala Phe Ser Asp Gly Asn Ile Glu Val Lys Leu  
385 390 395 400  
Cys Glu Gln Thr Glu Glu Lys Lys Lys Leu Arg His Leu Ala Leu  
405 410 415  
Phe Arg Ser Glu Leu Ala Glu Asn Ser Pro Leu Asp Ser Gly His  
420 425 430  
<210> 2  
<211> 1293  
<212> DNA  
<213> Human  
<400> 2  
ATGCAGGCGG TTACATTAC CCGGAGCAG TTCTCTGGC TGCTGGGA TCACACCTG 60  
ACGGGGAGC AGTTCATGCG TCTGTACGG CTGGACCGG TGTCTACAC CCCAGAGCTG 120  
CCGGACGGG CCAAGCTGGC CCTGCTGCTC ACCGGGTGC TCATCTTGG CTTGGGGCTC 180  
TTTGGCAATG CTCTGGTGT CTACGTGGTG ACCCGCAGCA AGCCCATGG CACCTGCACC 240  
AAGATCTTA TGTGCTCTT GGGGCTCAGT GACCTGCTCA TCACCTTCTT CTGCATTCCC 300  
GTACCATGC TCCAGACAT TTCAGACAC TGGCTGGGG GTGCTTTCAT TTGCAAGATG 360  
GTGGCATTG TCCAGTCTAC CGCTGTTTG ACAGAAATCC TCACATGAC CTGCAATTGT 420  
GTGGAAAGG ACCAGGACT TGTGCATCT TTTAAATGA AGTGGCAATA CACCAACCGA 480  
AGGGCTTCA CAATGTAGG TGTGTTCTGG CTGGTGGCAG TCATGCTAGG ATCACCCTAG 540  
TGGCAGCTGC AACAACTGA GATCAATAT GACTTCCTAT ATGAAAGGA ACACATCTGC 600  
TGCTAGAAG AGTGGACCAG CCTGTGCAC CAGAAGATCT ACACCACCTT CATCTTGTG 660  
ATCTCTTCC TCCTGCTCT TATGCTGATG CTTATTCTGT ACAGTAAAT TGGTTATGAA 720

4/5

CTTGGATTA AGAAAAGACT TGGGATGCT TCACTGCTC GAACTATCA TGGAAAGAA 780  
ATGTCAGAA TAGCCAGGAA GAAAGAGCA GCTGCAATTA TGATGTCAC AGCGTGGCT 840  
CTCTTTGCTG TGTGCTGGC ACCATTCCAT GTTGTGATA TGATGATGA ATACGTAAT 900  
TTGAAAGG AATATGATGA TGTGACATC AAGATGATTT TTGCTATGCT GCAATTAAT 960  
GCAATTTCA ACTGCACTG TAACTCCAT GTCTATGCAAT TTATGATGA AAATTTCAA 1020  
AAAACTTT TGTGTCAGT TTGTATGCT ATAGTAATA AAACCTTCTC TCCAGCAGA 1080  
AGCAATGGA ATTACGAAT TACAATGATG CCGAAGAAAG CAAATTTTC CTCAGAGAG 1140  
AATCAGTGC AGGAACCAA AGCAGAGCA TTGAGTGATG GCAACATGA ACTCAATTC 1200  
TGTGAACAG CAGAGAGAA GAAAAGCTC AAGCAGATC TTGCTCTCTT TAGGCTGAA 1260  
CTGCTGAGA ATTCTCTT AGACGTGCG CAT 1293

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 37

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 3

TGTACGATG CAGGGCTTA ACATTACCCG GAGCAG 37

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 37

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 4

GACTAGTTA ATGCCACTG TCTAAGAG AATTCTC 37

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 22

5/5

<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223>  
<400> 5  
CAATGCTACG TGTGCTGCG CT 22  
<210> 6  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223>  
<400> 6  
GATCTCACT TGTTCACGT GC 22  
<210> 7  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223>  
<400> 7  
TGGAGTCAT CGTAGATCA CCGATG 26

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP00/05684

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int. Cl.<sup>7</sup> C12N15/12, C12N15/09, C07K14/705, C07K16/28, C12P21/02, A61K45/00, A61P43/00, G01N33/566, G01N33/15, G01N33/50  
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED  
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int. Cl.<sup>7</sup> C12N15/12, C12N15/09, C07K14/705, C07K16/28, C12P21/02, A61K45/00, A61P43/00, G01N33/566, G01N33/15, G01N33/50  
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
GenBank/EMBL/DBJ/GenSeq, BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P. X	WO, 00/11015, A1 (ALPHAGEN, INC), 02 March, 2000 (02.03.00) & AU, 9957847, A	1-14
P. X	WO, 00/22131, A2 (BEHAN, Dominic, P. et al.), 20 April, 2000 (20.04.00) & AU, 9962991, A	1-14
Y	LIBERT, F. et al., "Selective amplification and cloning of four new members of the G protein-coupled receptor family", Science (1989), Vol. 244, No. 4904, pp.569-572	1-14
Y	NOTHACKER, H. P. et al., "Molecular cloning of a novel, putative G protein-coupled receptor from sea anemones structurally related to members of the FSH, TSH, LH/CG receptor family from mammals", BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. (1993) Vol.197, No.3, pp.1062-1069	1-14
Y	EP, 877083, A (SMITHKLINE BEECHAM CORP.), 11 November, 1998 (11.11.98) & JP, 11-75870, A	1-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
"E" earlier document but published on or after the international filing date  
"L" document which may raise doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other information  
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed  
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
12 December, 2000 (12.12.00)

Date of mailing of the international search report  
19 December, 2000 (19.12.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05684

## C. (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO, 97/24436, A2 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.), 10 July, 1997 (10.07.97) & AU, 1208497, A & JP, 10-146192, A & EP, 870020, A & CN, 1207126, A	1-14

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

## 国際調査報告

PCT/JPO0/05684

## 国際調査報告

PCT/JPO0/05684

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. <sup>1</sup> C12N15/12, C12N15/09, C07K14/705, C07K16/28, C12P21/02, A61K45/00, A61P43/00, G01N33/566, G01N33/15, G01N33/50		
B. 調査を行った分野		
調査を行った分野 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. <sup>1</sup> C12N15/12, C12N15/09, C07K14/705, C07K16/28, C12P21/02, A61K45/00, A61P43/00, G01N33/566, G01N33/15, G01N33/50		
発明の属する分野以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使った電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
GenBank/EMBL/DBJ/GenSeq, BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献のカテゴリ*	引用文献名、及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
P, X	WO, 00/11015, A1 (ALPHAGEN, INC) 2, 3月, 2000 (02. 03. 00) &AU, 9957847, A	1-14
P, X	WO, 00/22131, A2 (BEHAN, Dominic, P. et al) 20, 4月, 2000 (20. 04. 00) &AU, 9962991, A	1-14

C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテンツファミリーに関する別紙を参照。

## 引用文献のカテゴリ

- [A] 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- [E] 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日後に公表されたもの
- [L] 優先権主張に該発明を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
- [O] 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- [P] 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願
- [T] 特許文献の出願後に公表された文献
- [X] 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性は進歩性がないと考えられるもの
- [Y] 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- [&] 同一パテンツファミリー文献

国際調査を完了した日

12. 12. 00

国際調査報告の発送日

19.12.00

国際調査機関の名称及び住所	特許庁審査官 (権限のある職員)	4B	9735
日本国特許庁 (ISA/JP)	六五 紀子	印	
郵便番号100-8915	電話番号 03-3581-1101	内線 3448	
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号			

様式PCT/ISA/210 (第2ページ) (1998年7月)

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献のカテゴリ*	引用文献名、及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
Y	LIBERT, F. et al. "Selective amplification and cloning of four new members of the G protein-coupled receptor family", Science (1989) 第244巻, 第4904号, p. 569-572	1-14
Y	NOTHACKER, H. P. et al. "Molecular cloning of a novel putative G protein-coupled receptor from sea anemones structurally related to members of the FSH, TSH, LH/CG receptor family from mammals", BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. (1993) 第197巻, 第3号, p. 1062-1069	1-14
Y	EP, 877083, A (SMITHKLINE BEECHAM CORP.) 11. 11月, 1998 (11. 11. 98) & JP, 11-75870, A	1-14
Y	WO, 97/24436, A2 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) 10. 7月, 1997 (10. 07. 97) &AU, 1208497, A &JP, 10-146192, A &EP, 8770020, A &CN, 1207126, A	1-14

様式PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (1998年7月)





担当者	G・M	Pat・M	部長
特許	手続	力	条約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人

高橋 秀一

殿

あて名

〒 532-0024

大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85  
武田薬品工業株式会社 知的財産部

PCT

国際予備審査報告の送付の通知書

(法施行規則第57条)  
[PCT規則71.1]発送日  
(日.月.年)

22.05.01

受付

01.5.23

知的財産部

出願人又は代理人  
の書類記号

2633WOOP

重要な通知

国際出願番号

PCT/JPO0/05684

国際出願日

(日.月.年) 24.08.00

優先日

(日.月.年) 27.08.99

出願人（氏名又は名称）

武田薬品工業株式会社

1. 国際予備審査機関は、この国際出願に関して国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、それらをこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。
2. 国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、すべての選択官庁に通知するために、それらの写しを国際事務局に送付する。
3. 選択官庁から要求があったときは、国際事務局は国際予備審査報告（付属書類を除く）の英語の翻訳文を作成し、それをその選択官庁に送付する。
4. 注 意

出願人は、各選択官庁に対し優先日から30月以内に（官庁によってはもっと遅く）所定の手続（翻訳文の提出及び国内手数料の支払い）をしなければならない（PCT39条（1））（様式PCT/IB/301とともに国際事務局から送付された注を参照）。

国際出願の翻訳文が選択官庁に提出された場合には、その翻訳文は、国際予備審査報告の付属書類の翻訳文を含まなければならない。

この翻訳文を作成し、関係する選択官庁に直接送付するのは出願人の責任である。

選択官庁が適用する期間及び要件の詳細については、PCT出願人の手引き第II巻を参照すること。

名称及びあて名

日本国特許庁（IPEA/JP）

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員

特許庁長官

4N 9839

電話番号 03-3581-1101 内線 3488



## 注 意

### 1. 文献の写しの請求について

国際予備審査報告に記載された文献であって国際調査報告に記載されていない文献の複写

特許庁にこれらの引用文献の写しを請求することができますが、日本特許情報機構でもこれらの引用文献の複写物を販売しています。日本特許情報機構に引用文献の複写物を請求する場合は下記の点に注意してください。

#### 〔申込方法〕

(1) 特許（実用新案・意匠）公報については、下記の点を明記してください。

○特許・実用新案及び意匠の種類

○出願公告又は出願公開の年次及び番号（又は特許番号、登録番号）

○必要部数

(2) 公報以外の文献の場合は、下記の点に注意してください。

○国際予備審査報告の写しを添付してください（返却します）。

#### 〔申込み及び照会先〕

〒135-0016 東京都江東区東陽4-1-7 佐藤ビル

財団法人 日本特許情報機構 情報処理部業務課

TEL 03-3508-2313

注) 特許庁に対して文献の写しの請求をすることができる期間は、国際出願日から7年です。

2. 各選択官庁に対し、国際出願の写し（既に国際事務局から送達されている場合は除く）及びその所定の翻訳文を提出し、国内手数料を支払うことが必要となります。その期限については各国ごとに異なりますので注意してください。（条約第22条、第39条及び第64条(2)(a)(i)参照）



P C T

## 国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
〔P C T 3 6 条及びP C T 規則70〕

出願人又は代理人 の書類記号 2 6 3 3 W O O P	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式P C T / I P E A / 4 1 6）を参照すること。	
国際出願番号 P C T / J P 0 0 / 0 5 6 8 4	国際出願日 (日.月.年) 2 4 . 0 8 . 0 0	優先日 (日.月.年) 2 7 . 0 8 . 9 9
国際特許分類 ( I P C ) Int. Cl <sup>7</sup> C12N 15/12, C12N 15/09, C07K 14/705, C07K 16/28, C12P 21/02, A61K 45/00, A61P 43/00, G01N 33/566, G01N 33/15, G01N 33/50		
出願人 (氏名又は名称) 武田薬品工業株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 ( P C T 3 6 条 ) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。
- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。  
( P C T 規則70.16及びP C T 実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で \_\_\_\_\_ ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
  - II ☐ 優先権
  - III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
  - IV ☐ 発明の単一性の欠如
  - V ☒ P C T 3 5 条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
  - VI ☐ ある種の引用文献
  - VII ☐ 国際出願の不備
  - VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 2 9 . 0 9 . 0 0	国際予備審査報告を作成した日 1 5 . 0 5 . 0 1	
名称及びあて先 日本国特許庁 ( I P E A / J P ) 郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 上 條 肇	4 N 9 8 3 9
電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8		



## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- |                          |            |         |        |                      |
|--------------------------|------------|---------|--------|----------------------|
| <input type="checkbox"/> | 明細書        | 第 _____ | ページ、   | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> | 明細書        | 第 _____ | ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> | 明細書        | 第 _____ | ページ、   | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> | 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> | 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | PCT19条の規定に基づき補正されたもの |
| <input type="checkbox"/> | 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> | 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> | 図面         | 第 _____ | ページ/図、 | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> | 図面         | 第 _____ | ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> | 図面         | 第 _____ | ページ/図、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> | 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、   | 出願時に提出されたもの          |
| <input type="checkbox"/> | 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> | 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、   | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)





## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)

請求の範囲

1-14

有

請求の範囲

無

進歩性(IS)

請求の範囲

有

請求の範囲

1-14

無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲

1-14

有

請求の範囲

無

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

引用文献1: LIBERT, F. et al. "Selective amplification and cloning of four new members of the G protein-coupled receptor family", Science (1989), 第244巻, 第4904号, p. 569-572

引用文献2: EP, 877083, A (SMITHKLINE BEECHAM CORP.)  
11.11月.1998 (11.11.98) & JP, 11-75870, A

請求の範囲 1-14

引用文献1には、公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質において保存されている配列をもとにプライマーを作製し、該プライマーを用いてcDNAライブラリーから新規のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をクローニングしてDNA配列及びアミノ酸配列を決定したことが記載されている。

引用文献2には、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を同定する際に由来としてヒト脳を用いたことが記載されている。

ここで、引用文献2のようにヒト脳からG蛋白質共役型レセプター蛋白質を同定すること、この際に引用文献1に記載されたように公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質において保存されている配列をもとにプライマーを作製して新規のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を同定することは当業者が容易に想到し得たものと認められ、このようにして得られる新規なG蛋白質共役型レセプター蛋白質と比較して、本願において単離された特定のG蛋白質共役型レセプター蛋白質は格別予想もできない効果を奏するものとも認められない。

また、得られた蛋白質に対する抗体を作製すること、リガンドを決定すること、リガンドとの結合性をかえる化合物をスクリーニングすること等は当業者が必要に応じて適宜なし得たものと認める。

従って、請求の範囲1乃至14に係る発明は引用文献1及び2の記載に基づいて当業者が容易になし得たものと認める。



特 許 協 力 条 約

発信人 日本国特許庁 (国際調査機関)

出願人代理人

高橋 秀一

殿

あて名

〒 532-0024

大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85  
武田薬品工業株式会社大阪工場内

PCT

国際調査報告又は国際調査報告を作成しない旨  
の決定の送付の通知書

(法施行規則第41条)

[PCT規則44.1]

発送日  
(日.月.年)

19.12.00

出願人又は代理人  
の書類記号

2633WOOP

今後の手続きについては、下記1及び4を参照。

国際出願番号

PCT/JPO0/05684

国際出願日  
(日.月.年)

24.08.00

出願人 (氏名又は名称)

武田薬品工業株式会社

- ☒ 国際調査報告が作成されたこと、及びこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。  
PCT19条の規定に基づく補正書及び説明書の提出  
出願人は、国際出願の請求の範囲を補正することができる (PCT規則46参照)。  
いつ 補正書の提出期間は、通常国際調査報告の送付の日から2月である。  
詳細については添付用紙の備考を参照すること。  
どこへ 直接次の場所へ  
The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland  
Facsimile No.: (41-22)740.14.35  
詳細な手続については、添付用紙の備考を参照すること。
- ☐ 国際調査報告が作成されないこと、及び法第8条第2項 (PCT17条(2)(a)) の規定による国際調査報告を作成しない旨の決定をこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。
- ☐ 法施行規則第44条 (PCT規則40.2) に規定する追加手数料の納付に対する異議の申立てに関して、出願人に下記の点を通知する。  
☐ 異議の申立てと当該異議についての決定を、その異議の申し立てと当該異議についての決定の両方を指定官庁へ送付することを求める出願人の請求とともに、国際事務局へ送付した。  
☐ 当該異議についての決定は、まだ行われていない。決定されしだい出願人に通知する。
- 今後の手続： 出願人は次の点に注意すること。  
優先日から18月経過後、国際出願は国際事務局によりすみやかに国際公開される。出願人が公開の延期を望むときは、国際出願又は優先権の主張の取下げの通知がPCT規則90の2.1及び90の2.3にそれぞれ規定されているように、国際公開の事務的な準備が完了する前に国際事務局に到達しなければならない。  
出願人が優先日から30月まで (官庁によってはもっと遅く) 国内段階の開始を延期することを望むときは、優先日から19月以内に、国際予備審査の請求書が提出されなければならない。  
国際予備審査の請求書若しくは、後にする選択により優先日から19箇月以内に選択しなかった又は第II章に拘束されないため選択できなかったすべての指定官庁に対しては優先日から20月以内に、国内段階の開始のための所定手続を取らなければならない。

名称及びあて名

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員

特許庁長官

4B

9735

電話番号 03-3581-1101 内線 3448



## 注 意

1. 国際調査報告の発送日から起算する条約第19条(1)及び規則46.1に従う国際事務局への補正期間に注意してください。
2. 条約22条(2)に規定する期間に注意してください。
3. 文献の写しの請求について

国際調査報告に記載した文献の複写

特許庁にこれらの引用文献の写しを請求することもできますが、日本特許情報機構でもこれらの引用文献の複写物を販売しています。日本特許情報機構に引用文献の複写物を請求する場合は下記の点に注意してください。

〔申込方法〕

(1) 特許(実用新案・意匠)公報については、下記の点を明記してください。

○特許・実用新案及び意匠の種類

○出願公告又は出願公開の年次及び番号(又は特許番号、登録番号)

○必要部数

(2) 公報以外の文献の場合は、下記の点に注意してください。

○国際調査報告の写しを添付してください(返却します)。

〔申込み及び照会先〕

〒135 東京都江東区東陽4-1-7 佐藤ダイヤビル  
財団法人 日本特許情報機構 サービス課  
TEL 03-5690-3900

注意 特許庁に対して文献の写しの請求をすることができる期間は、国際出願日から7年です。



この備考は、PCT 19条の規定に基づく補正書の提出に関する基本的な指示を与えるためのものである。この備考は特許協力条約並びにこの条約に基づく規則及び実施細則の規定に基づいている。この備考とそれらの規定とが相違する場合には、後者が適用される。詳細な情報については、WIPOの出版物であるPCT出願人の手引も参照すること。

#### PCT 19条の規定に基づく補正書の提出に関する指示

出願人は、国際調査報告を受領した後、国際出願の請求の範囲を補正する機会が一回ある。しかし、国際出願のすべての部分（請求の範囲、明細書及び図面）が、国際予備審査の手續においても補正できるもので、例えば出願人が仮保護のために補正書を公開することを希望する場合又は国際公開前に請求の範囲を補正する別の理由がある場合を除き、通常PCT 19条の規定に基づく補正書を提出する必要はないことを強調しておく。さらに、仮保護は一部の国のみで与えられるだけであることも強調しておく。

#### 補正の対象となるもの

PCT 19条の規定により請求の範囲のみ補正することができる。

国際段階においてPCT 34条の規定に基づく国際予備審査の手續において請求の範囲を（更に）補正することができる。

明細書及び図面は、PCT 34条の規定に基づく国際予備審査の手續においてのみ補正することができる。

国内段階に移行する際、PCT 28条（又はPCT 41条）の規定により、国際出願のすべての部分を補正することができる。

#### いつ

国際調査報告の送付の日から2月又は優先日から16月の内どちらか遅く満了するほうの期間内。しかし、その期間の満了後であっても国際公開の技術的な準備の完了前に国際事務局が補正を受領した場合には、その補正書は、期間内に受理されたものとみなすことを強調しておく（PCT規則46.1）。

#### 補正書を提出すべきところ

補正書は、国際事務局のみに提出でき、受理官庁又は国際調査機関には提出してはいけない（PCT規則46.2）。国際予備審査の請求書を提出した／する場合には、以下を参照すること。

#### どのように

1以上の請求の範囲の削除、1以上の新たな請求の範囲の追加、又は1以上の請求の範囲の記載の補正による。

差替え用紙は、補正の結果、出願当初の用紙と相違する請求の範囲の各用紙毎に提出する。

差替え用紙に記載されているすべての請求の範囲には、アラビア数字を付さなければならない。請求の範囲を削除する場合、その他の請求の範囲の番号を付け直す必要はない。請求の範囲の番号を付け直す場合には、連続番号で付け直すなければならない（PCT実施細則第205号(b)）。

補正は国際公開の言語で行う。

#### 補正書にどのような書類を添付しなければならないか

##### 書簡（PCT実施細則第205号(b)）

補正書には書簡を添付しなければならない。

書簡は国際出願及び補正された請求の範囲とともに公開されることはない。これを「PCT 19条(1)に規定する説明書」と混同してはならない（「PCT 19条(1)に規定する説明書」については、以下を参照）。

書簡は、英語又は仏語を選択しなければならない。ただし、国際出願の言語が英語の場合、書簡は英語で、仏語の場合、書簡は仏語で記載しなければならない。

書簡には、出願時の請求の範囲と補正された請求の範囲との相違について表示しなければならない。特に、国際出願に記載した各請求の範囲との関連で次の表示（2以上の請求の範囲についての同一の表示する場合は、まとめることができる。）をしなければならない。

- (i) この請求の範囲は変更しない。
- (ii) この請求の範囲は削除する。
- (iii) この請求の範囲は追加である。
- (iv) この請求の範囲は出願時の1以上の請求の範囲と差し替える。
- (v) この請求の範囲は出願時の請求の範囲の分割の結果である。





次に、添付する書簡中での、補正についての説明の例を示す。

1. [請求の範囲の一部の補正によって請求の範囲の項数が48から51になった場合] :  
“請求の範囲1-29、31、32、34、35、37-48項は、同じ番号のもとに補正された請求の範囲と置き換えられた。請求の範囲30、33及び36項は変更なし。新たに請求の範囲49-51項が追加された。”
2. [請求の範囲の全部の補正によって請求の範囲の項数が15から11になった場合] :  
“請求の範囲1-15項は、補正された請求の範囲1-11項に置き換えられた。”
3. [原請求の範囲の項数が14で、補正が一部の請求の範囲の削除と新たな請求の範囲の追加を含む場合] :  
“請求の範囲1-6及び14項は変更なし。請求の範囲7-13は削除。新たに請求の範囲15、16及び17項を追加。”又は  
“請求の範囲7-13は削除。新たに請求の範囲15、16及び17項を追加。その他の全ての請求の範囲は変更なし。”
4. [各種の補正がある場合] :  
“請求の範囲1-10項は変更なし。請求の範囲11-13、18及び19項は削除。請求の範囲14、15及び16項は補正された請求の範囲14項に置き換えられた。請求の範囲17項は補正された請求の範囲15、16及び17項に分割された。新たに請求の範囲20及び21項が追加された。”

“PCT19条(1)の規定に基づく説明書”(PCT規則46.4)

補正書には、補正並びにその補正が明細書及び図面に与える影響についての説明書を提出することができる(明細書及び図面はPCT19条(1)の規定に基づいては補正できない)。

説明書は、国際出願及び補正された請求の範囲とともに公開される。

説明書は、国際公開の言語で作成しなければならない。

説明書は、簡潔でなければならない、英語の場合又は英語に翻訳した場合に500語を越えてはならない。

説明書は、出願時の請求の範囲と補正された請求の範囲との相違を示す書簡と混同してはならない。説明書を、その書簡に代えることはできない。説明書は別紙で提出しなければならない、見出しを付すものとし、その見出しは“PCT19条(1)の規定に基づく説明書”の語句を用いることが望ましい。

説明書には、国際調査報告又は国際調査報告に列記された文献との関連性に関して、これらを誹謗する意見を記載してはならない。国際調査報告に列記された特定の請求の範囲に関連する文献についての言及は、当該請求の範囲の補正に関してのみ行うことができる。

国際予備審査の請求書が提出されている場合

PCT19条の規定に基づく補正書及び添付する説明書の提出の時に国際予備審査の請求書が既に提出されている場合には、出願人は、補正書(及び説明書)を国際事務局に提出すると同時にその写し及び必要な場合、その翻訳文を国際予備審査機関にも提出することが望ましい(PCT規則55.3(a)、62.2の第1文を参照)。詳細は国際予備審査請求書(PCT/IPEA/401)の注意書参照。

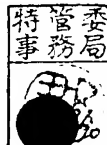
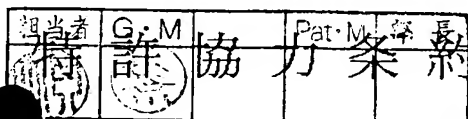
国内段階に移行するための国際出願の翻訳に関して

国内段階に移行する際、PCT19条の規定に基づいて補正された請求の範囲の翻訳を出願時の請求の範囲の翻訳の代わりに又は追加して、指定官庁/選択官庁に提出しなければならないこともあるので、出願人は注意されたい。

指定官庁/選択官庁の詳細な要求については、PCT出願人の手引きの第II巻を参照。



9/7 東京  
Fax (印)  
EM # 2L 3304891505



237回(2001.9月～10月)  
11省議.

3

発信人 日本国特許庁 (受理官)

出願人代理人

高橋 秀一

殿

あて名

〒532-0024

大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85  
武田薬品工業株式会社知的財産部

PCT/JP00/05684

RO105

P C T

## 国際出願番号及び 国際出願日の通知書

(法施行規則第22条、第23条)  
〔PCT規則20.5(c)〕

受付

00.9.-7

知的財産部

発送日 (日. 月. 年)

05.09.00

出願人又は代理人

の書類記号

2633WOOP

重要な通知

国際出願番号

PCT/JP00/05684

国際出願日 (日. 月. 年)

24.08.00

優先日 (日. 月. 年)

27.08.99

出願人 (氏名又は名称)

武田薬品工業株式会社

1. この国際出願は、上記の国際出願番号及び国際出願日が付与されたことを通知する。

記録原本は、05日09月00年に国際事務局に送付した。

### 注 意

- 国際出願番号は、特許協力条約を表示する「PCT」の文字、斜線、受理官庁を表示する2文字コード (日本の場合JP)、西暦年の最後から2桁の数字、斜線、及び5桁の数字からなっています。
- 国際出願日は、「特許協力条約に基づく国際出願に関する法律」第4条第1項の要件を満たした国際出願に付与されます。
- あて名等を変更したときは、速やかにあて名の変更届等を提出して下さい。
- 電子計算機による漢字処理のため、漢字の一部を当用漢字、又は、仮名に置き換えて表現してある場合もありますので御了承下さい。
- この通知に記載された出願人のあて名、氏名 (名称) に誤りがあるときは申出により訂正します。
- 国際事務局は、受理官庁から記録原本を受領した場合には、出願人にその旨を速やかに通知 (様式PCT/IB/301) する。記録原本を優先日から14箇月が満了しても受領していないときは、国際事務局は出願人にその旨を通知する。〔PCT規則22.1(c)〕

名称及びあて名

日本国特許庁 (RO/JP)

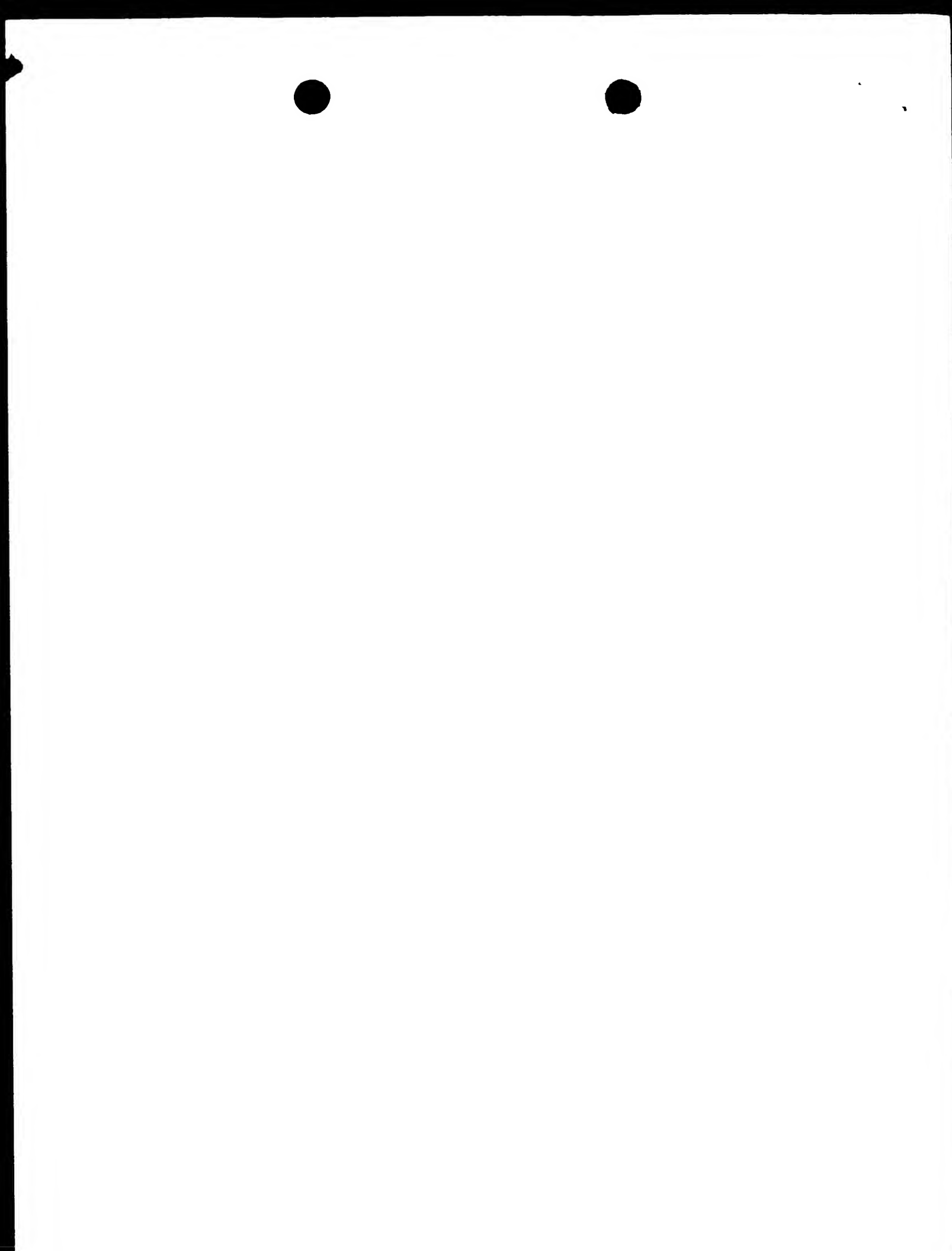
郵便番号 100-8915 TEL 03-3592-1308

日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

様式PCT/RO/105 (1998年7月)

権限のある職員

特 許 庁 長 官



PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF  
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

To:

TAKAHASHI, Shuichi  
Osaka Plant of Takeda Chemical  
Industries, Ltd.  
17-85, Jusohonmachi 2-chome  
Yodogawa-ku  
Osaka-shi  
Osaka 532-0024  
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 26 September 2000 (26.09.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 2633WOOP	International application No. PCT/JP00/05684

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. (for all designated States except US)

WATANABE, Takuya et al (for US)

International filing date : 24 August 2000 (24.08.00)  
Priority date(s) claimed : 27 August 1999 (27.08.99)  
Date of receipt of the record copy  
by the International Bureau : 12 September 2000 (12.09.00)  
List of designated Offices :

AP : GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW

EA : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE

OA : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG

National : AE, AG, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, DZ, EE, GD, GE, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MX, MZ, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI,  
SK, TJ, TM, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA

## ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- ☒ time limits for entry into the national phase  
☒ confirmation of precautionary designations  
☒ requirements regarding priority documents

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

Masashi HONDA

Telephone No. (41-22) 338.83.38



担当者 G・M  
PATENT COOPERATION TREATY

12

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING  
SUBMISSION OR TRANSMITTAL  
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

TAKAHASHI, Shuichi  
Osaka Plant of Takeda Chemical  
Industries, Ltd.  
17-85, Jusohonmachi 2-chome  
Yodogawa-ku  
Osaka-shi  
Osaka 532-0024  
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 06 November 2000 (06.11.00)	
Applicant's or agent's file reference 2633WO0P	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP00/05684	International filing date (day/month/year) 24 August 2000 (24.08.00)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 27 August 1999 (27.08.99)
Applicant TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. et al	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(\*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
27 Augu 1999 (27.08.99)	11/241530	JP	13 Octo 2000 (13.10.00)



<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No. (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer</p> <p>Magda BOUACHA</p> <p>Telephone No. (41-22) 338.83.38</p>
---	---





特

担当	G・M	Pat・M	課長
特許	協力	条約	

8

発信人 日本国特許庁（国際調査機関）

出願人代理人

高橋 秀一

殿

あて名

〒532-0024

大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85  
武田薬品工業株式会社知的財産部

P C T

## 調査用写しの受理通知書

(法施行規則第39条)  
〔PCT規則25.1〕

受付

00.9.28

知的財産部

PCT/JP00/05684

SA202

発送日（日．月．年）

26.09.00

出願人又は代理人  
の書類記号

2633WOOP

重 要 な 通 知

国際出願番号

PCT/JP00/05684

国際出願日（日．月．年）

24.08.00

優先日（日．月．年）

27.08.99

出願人（氏名又は名称）

武田薬品工業株式会社

1. 国際調査機関と受理官庁が同一の機関でない場合、

国際出願の調査用写しを国際調査機関が下記の日に受理したので通知する。

国際調査機関と受理官庁が同一の機関である場合、

国際出願の調査用写しを下記の日に受理したので通知する。

26日09月00年（受理の日）2. ☒ 調査用写しには、コンピューター読取りが可能な形式によるヌクレオチド又はアミノ酸の配列表が添付されている。

3. 国際調査報告の作成期間

国際調査報告の作成期間は、上記受理の日から3箇月の期間又は優先日から9箇月の期間のいずれか遅く満了する期間である。

4. この通知書の写しは、国際事務局及び上記1の第1文が適用される場合には受理官庁に送付した。

名称及びあて名

日本国特許庁（ISA/JP）

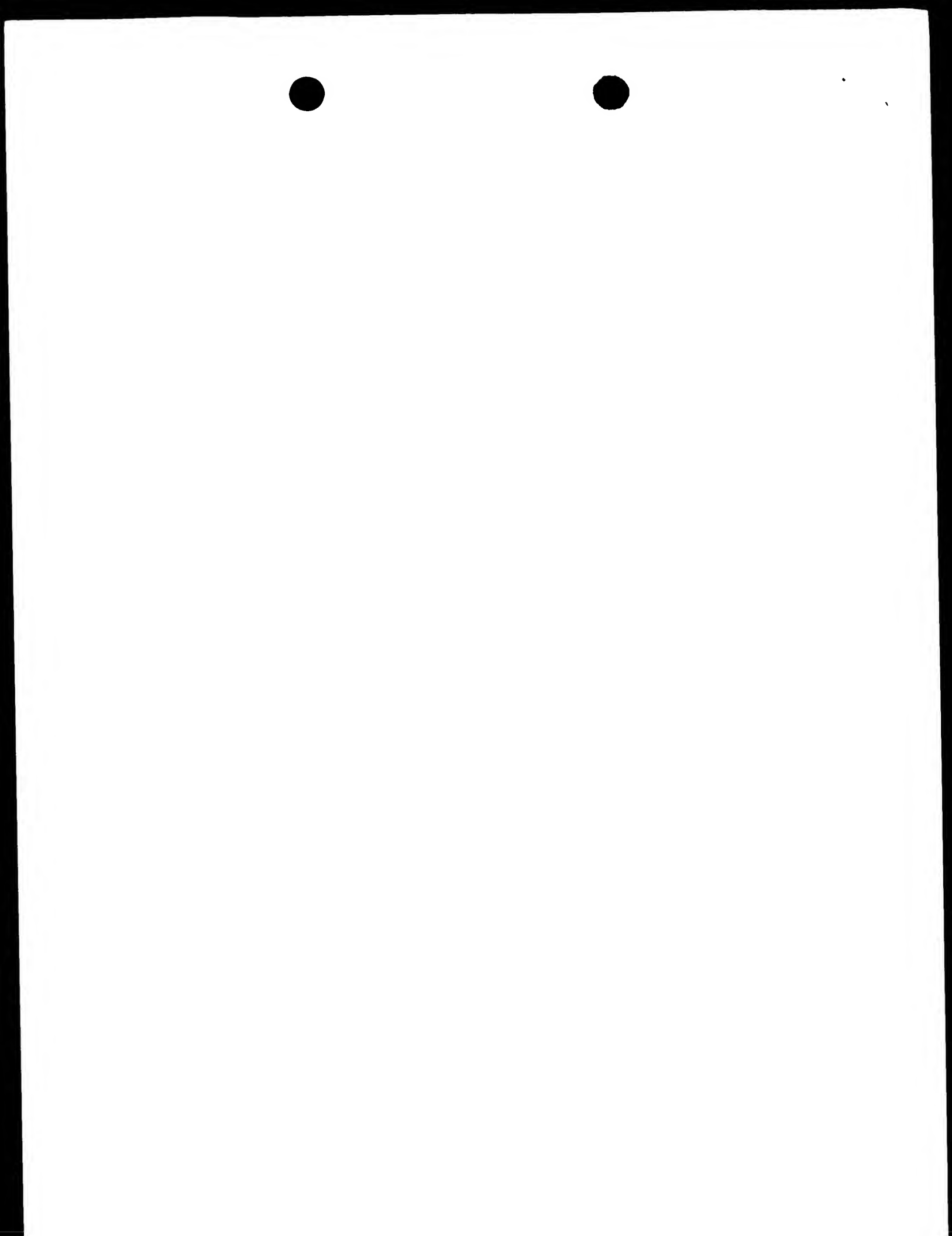
郵便番号 100-8915 TEL 03-3592-1308

日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

様式PCT/ISA/202（1998年7月）

権限のある職員

特 許 庁 長 官



## 特許協力条約に基づく国際出願

願

書

出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。

国際出願番号 受理官庁記入欄

国際出願日

24.8.00

(受付印)

受領印

出願人又は代理人の書類記号  
(希望する場合、最大12字)

2633WO0P

## 第I欄 発明の名称

新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質およびそのDNA

## 第II欄 出願人

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

武田薬品工業株式会社

TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.

〒541-0045 日本国大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi,

OSAKA 541-0045 JAPAN

☐ この欄に記載した者は、  
発明者でもある。

電話番号:

ファクシミリ番号:

加入電話番号:

国籍(国名): 日本国 Japan

住所(国名): 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の  
指定国についての出願人である。☐

すべての指定国

☒

米国を除くすべての指定国

☐

米国のみ

☐

追記欄に記載した指定国

## 第III欄 その他の出願人又は発明者

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

渡辺卓也

WATANABE Takuya

〒532-0033 日本国大阪府大阪市淀川区新高6丁目14番9-B904号

14-9-B904, Niitaka 6-chome, Yodogawa-ku, Osaka-shi, OSAKA

532-0033 JAPAN

この欄に記載した者は、  
次に該当する:
☐ 出願人のみである。

☒ 出願人及び発明者である。

☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したときは、  
以下に記入しないこと)

国籍(国名): 日本国 Japan

住所(国名): 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の  
指定国についての出願人である:☐

すべての指定国

☐

米国を除くすべての指定国

☒

米国のみ

☐

追記欄に記載した指定国

☒ その他の出願人又は発明者が続葉に記載されている。

## 第IV欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名

次に記載された者は、国際機関において出願人のために行動する:

☒

代理人

☐

共通の代表者

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

11404 弁理士 高橋秀一 TAKAHASHI Shuichi

〒532-0024 日本国大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号

武田薬品工業株式会社大阪工場内

c/o Osaka Plant of TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.

17-85, Jusohonmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka-shi,

OSAKA 532-0024 JAPAN

電話番号:

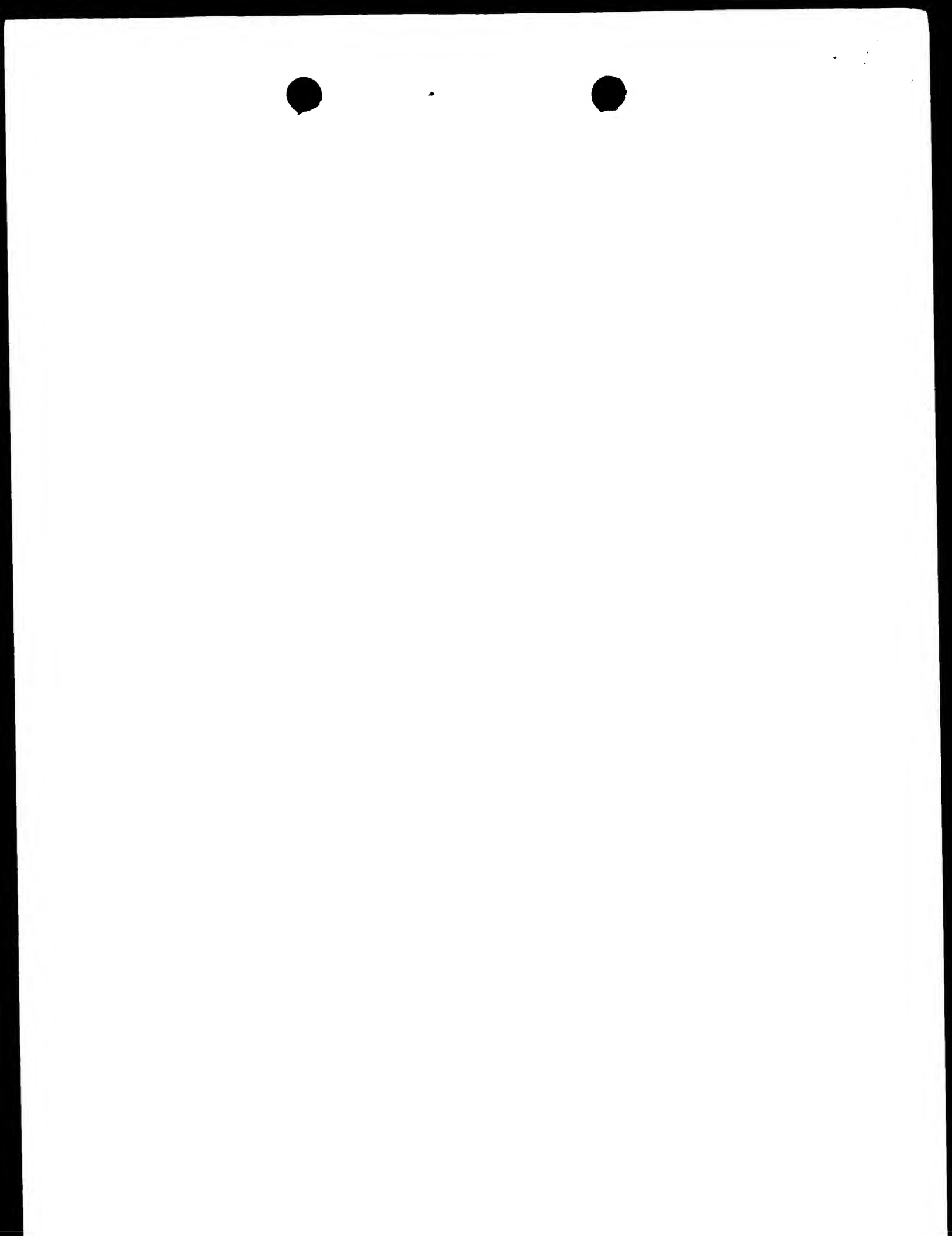
03-3278-2235

ファクシミリ番号:

03-3278-2222

加入電話番号:

☐ 通知のためのあて名: 代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す



第Ⅲ欄の続き その他の出願人又は発明者

この続葉を使用しないときは、この用紙を願書に含めないこと。

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

菊地久仁子 KIKUCHI Kuniko  
〒302-0024 日本国茨城県取手市新町5丁目8-18-101号  
8-18-101, Shinmachi 5-chome, Toride-shi, IBARAKI 302-0024 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

- ☐ 出願人のみである。  
☒ 出願人及び発明者である。  
☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍(国名): 日本国 Japan

住所(国名): 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である:

- ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

新谷靖 SHINTANI Yasushi  
〒305-0821 日本国茨城県つくば市春日1丁目7番地9-703号  
7-9-703, Kasuga 1-chome, Tsukuba-shi, IBARAKI 305-0821 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

- ☐ 出願人のみである。  
☒ 出願人及び発明者である。  
☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍(国名): 日本国 Japan

住所(国名): 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である:

- ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

この欄に記載した者は、次に該当する:

- ☐ 出願人のみである。  
☐ 出願人及び発明者である。  
☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍(国名):

住所(国名):

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である:

- ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☐ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

この欄に記載した者は、次に該当する:

- ☐ 出願人のみである。  
☒ 出願人及び発明者である。  
☐ 発明者のみである。  
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍(国名):

住所(国名):

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である:

- ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☐ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

☐ その他の出願人又は発明者が他の続葉に記載されている。



# 第Ⅴ欄 国の指定

規則 4. 9(a)の規定に基づき次の指定を行う ☐ する口にレ印を付すこと; 少なくとも1つの口に ☐ 付すこと。

## 広域特許

- ☒ **AP** **ARIPO特許**: GH ガーナ Ghana, GM ガンビア Gambia, KE ケニア Kenya, LS レソト Lesotho, MW マラウイ Malawi, SD スーダン Sudan, SL シエラ・レオネ Sierra Leone, SZ スワジランド Swaziland, TZ タンザニア United Republic of Tanzania, UG ウガンダ Uganda, ZW ジンバブエ Zimbabwe, 及びハラレプロトコルと特許協力条約の締約国である他の国
- ☒ **EA** **ユーラシア特許**: AM アルメニア Armenia, AZ アゼルバイジャン Azerbaijan, BY ベラルーシ Belarus, KG キルギス Kyrgyzstan, KZ カザフスタン Kazakhstan, MD モルドヴァ Republic of Moldova, RU ロシア Russian Federation, TJ タジキスタン Tajikistan, TM トルクメニスタン Turkmenistan, 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締約国である他の国
- ☒ **EP** **ヨーロッパ特許**: AT オーストリア Austria, BE ベルギー Belgium, CH and LI スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein, CY キプロス Cyprus, DE ドイツ Germany, DK デンマーク Denmark, ES スペイン Spain, FI フィンランド Finland, FR フランス France, GB 英国 United Kingdom, GR ギリシャ Greece, IE アイルランド Ireland, IT イタリア Italy, LU ルクセンブルグ Luxembourg, MC モナコ Monaco, NL オランダ Netherlands, PT ポルトガル Portugal, SE スウェーデン Sweden, 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国である他の国
- ☒ **OA** **OAPI特許**: BF ブルキナ・ファソ Burkina Faso, BJ ベナン Benin, CF 中央アフリカ Central African Republic, CG コンゴ Congo, CI コートジボアール Côte d'Ivoire, CM カメルーン Cameroon, GA ガボン Gabon, GN ギニア Guinea, GW ギニア・ビサウ Guinea-Bissau, ML マリ Mali, MR モーリタニア Mauritania, NE ニジェール Niger, SN セネガル Senegal, TD チャード Chad, TG トーゴ Togo, 及びアフリカ知的所有権機構のメンバー国と特許協力条約の締約国である他の国 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には点線の上に記載する)

## 国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には点線の上に記載する)

- |  |   |
|--|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AE</b> アラブ首長国連邦 United Arab Emirates            | <input type="checkbox"/> <b>LU</b> ルクセンブルグ Luxembourg   |
| <input type="checkbox"/> <b>AL</b> アルバニア Albania                                       | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LV</b> ラトヴィア Latvia  |
| <input type="checkbox"/> <b>AM</b> アルメニア Armenia                                       | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MA</b> モロッコ Morocco  |
| <input type="checkbox"/> <b>AT</b> オーストリア Austria                                      | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MD</b> モルドヴァ Republic of Moldova                                   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AU</b> オーストラリア Australia                        | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MG</b> マダガスカル Madagascar   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AZ</b> アゼルバイジャン Azerbaijan                      | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MK</b> マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国 The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BA</b> ボスニア・ヘルツェゴヴィナ Bosnia and Herzegovina     | <input type="checkbox"/> <b>MN</b> モンゴル Mongolia  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BB</b> バルバドス Barbados                           | <input type="checkbox"/> <b>MW</b> マラウイ Malawi  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BG</b> ブルガリア Bulgaria                           | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MX</b> メキシコ Mexico   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BR</b> ブラジル Brazil                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>NO</b> ノルウェー Norway  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BY</b> ベラルーシ Belarus                            | <input checked="" type="checkbox"/> <b>NZ</b> ニュー・ジーランド New Zealand                                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CA</b> カナダ Canada                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>PL</b> ポーランド Poland  |
| <input type="checkbox"/> <b>CH and LI</b> スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> <b>PT</b> ポルトガル Portugal  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CN</b> 中国 China                                 | <input checked="" type="checkbox"/> <b>RO</b> ルーマニア Romania   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CR</b> コスタリカ Costa Rica                         | <input checked="" type="checkbox"/> <b>RU</b> ロシア Russian Federation                                      |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CU</b> キューバ Cuba                                | <input type="checkbox"/> <b>SD</b> スーダン Sudan   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CZ</b> チェッコ Czech Republic                      | <input type="checkbox"/> <b>SE</b> スウェーデン Sweden  |
| <input type="checkbox"/> <b>DE</b> ドイツ Germany   | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SG</b> シンガポール Singapore  |
| <input type="checkbox"/> <b>DK</b> デンマーク Denmark                                       | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SI</b> スロヴェニア Slovenia   |
| <input type="checkbox"/> <b>DM</b> ドミニカ Dominica                                       | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SK</b> スロヴァキア Slovakia   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>EE</b> エストニア Estonia                            | <input type="checkbox"/> <b>SL</b> シエラ・レオネ Sierra Leone   |
| <input type="checkbox"/> <b>ES</b> スペイン Spain  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TJ</b> タジキスタン Tajikistan   |
| <input type="checkbox"/> <b>FI</b> フィンランド Finland                                      | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TM</b> トルクメニスタン Turkmenistan                                       |
| <input type="checkbox"/> <b>GB</b> 英国 United Kingdom                                   | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TR</b> トルコ Turkey  |
| <input type="checkbox"/> <b>GD</b> グレナダ Grenada  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TT</b> トリニダード・トバゴ Trinidad and Tobago                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GE</b> グルジア Georgia                             | <input type="checkbox"/> <b>TZ</b> タンザニア United Republic of Tanzania                                      |
| <input type="checkbox"/> <b>GH</b> ガーナ Ghana   | <input checked="" type="checkbox"/> <b>UA</b> ウクライナ Ukraine   |
| <input type="checkbox"/> <b>GM</b> ガンビア Gambia   | <input type="checkbox"/> <b>UG</b> ウガンダ Uganda  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>HR</b> クロアチア Croatia                            | <input checked="" type="checkbox"/> <b>US</b> 米国 United States of America                                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>HU</b> ハンガリー Hungary                            | <input checked="" type="checkbox"/> <b>UZ</b> ウズベキスタン Uzbekistan  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>ID</b> インドネシア Indonesia                         | <input checked="" type="checkbox"/> <b>VN</b> ヴィエトナム Viet Nam   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>IL</b> イスラエル Israel                             | <input checked="" type="checkbox"/> <b>YU</b> ユーゴスラヴィア Yugoslavia   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>IN</b> インド India                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>ZA</b> 南アフリカ共和国 South Africa                                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>IS</b> アイスランド Iceland                           | <input type="checkbox"/> <b>ZW</b> ジンバブエ Zimbabwe   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>JP</b> 日本 Japan                                 |   |
| <input type="checkbox"/> <b>KE</b> ケニア Kenya   |   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KG</b> キルギス Kyrgyzstan                          |   |
| <input type="checkbox"/> <b>KP</b> 北朝鮮 Democratic People's Republic of Korea           | <input checked="" type="checkbox"/> <b>DZ</b> アルジェリア Democratic People's Republic of Algeria              |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KR</b> 韓国 Republic of Korea                     | <input checked="" type="checkbox"/> <b>AG</b> アンティグア・バーブーダ Antigua and Barbuda                            |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KZ</b> カザフスタン Kazakhstan                        | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MZ</b> モザンビーク Mozambique   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>LC</b> セント・ルシア Saint Lucia                      | <input checked="" type="checkbox"/> <b>BZ</b> ベリーズ Belize   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>LK</b> スリ・ランカ Sri Lanka                         |   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>LR</b> リベリア Liberia                             |   |
| <input type="checkbox"/> <b>LS</b> レソト Lesotho   |   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>LT</b> リトアニア Lithuania                          |   |

以下の口は、この様式の施行後に特許協力条約の締約国となった国を指定 (国内特許のために) するためのものである

確認の指定の宣言 出願人は、上記の指定に加えて、規則 4. 9(b)の規定に基づき、特許協力条約の下で認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、この宣言から除く旨の表示を追記欄にした国は、指定から除かれる。出願人は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。(指定の確認(料金を含む)は、優先日から15月以内に受理官庁へ提出しなければならない。)





# 追記欄

この追記欄を使用しないときは、この用紙を願書に含めないこと。

## 1. 全ての情報を該当する欄の中に記載できないとき

この場合は、「第何欄...の続き」(欄番号を表示する)と表示し、記載できない欄の指示と同じ方法で情報を記載する。；特に、

(i) 出願人又は発明者として3人以上いる場合で、「続葉」を使用できないとき。

この場合は、「第Ⅲ欄の続き」と表示し、第Ⅲ欄で求められている同じ情報を、それぞれの者について記載する。

(ii) 第Ⅱ欄又は第Ⅲ欄の枠の中で、「追記欄に記載した指定国」にレ印を付しいるとき。

この場合は、「第Ⅱ欄の続き」、「第Ⅲ欄の続き」又は「第Ⅱ欄及び第Ⅲ欄の続き」と記載し、該当する出願人の氏名(名称)を表示し、それぞれの氏名(名称)の次にその者が出願人となる指定国(広域特許の場合は、ARIPO特許・ユーラシア特許・ヨーロッパ特許・OAPI特許)を記載する。

(iii) 第Ⅱ欄又は第Ⅲ欄の枠の中で、発明者又は発明者及び出願人である者か、すべての指定国のための又は米国のための発明者ではないとき。

この場合は、「第Ⅱ欄の続き」、「第Ⅲ欄の続き」又は「第Ⅱ欄及び第Ⅲ欄の続き」と記載し、該当する発明者の氏名を表示し、その者が発明者である指定国(広域特許の場合は、ARIPO特許・ユーラシア特許・ヨーロッパ特許・OAPI特許)を記載する。

(iv) 第Ⅳ欄に示す代理人以外に代理人がいるとき。

この場合は、「第Ⅳ欄の続き」と表示し、第Ⅳ欄で求められている同じ情報を、それぞれの代理人について記載する。

(v) 第Ⅴ欄において指定国又はOAPI特許が、「追加特許」又は「追加証」を伴うとき、又は、米国が「継続」又は「一部継続」を伴うとき。

この場合は、「第Ⅴ欄の続き」及び該当するそれぞれの指定国又はOAPI特許を表示し、それぞれの指定国又はOAPI特許の後に、原特許又は原出願の番号及び特許付与日又は原出願日を記載する。

(vi) 第Ⅴ欄において優先権を主張する先の出願が1件以上あるとき。

この場合は、「第Ⅴ欄の続き」と表示し、第Ⅴ欄で求められている同じ情報を、それぞれの先の出願について記載する。

(vii) 第Ⅴ欄において先の出願がARIPOの特許出願であるとき。

この場合は、「第Ⅴ欄の続き」と表示し、その先の出願に対応する項目の番号を特定して、更に、その先の出願を行った工業所有権の保護のためのパリ条約同盟国の少なくとも1ヶ国を表示する。

## 2. 出願人が、第Ⅴ欄における確認の指定の宣言に関し、その宣言からいずれかの国を除くことを希望するとき。

この場合は、「確認の指定の宣言から、以下の指定国を除く」と記載し、除かれる国名又は2文字の国コードを表示する。

## 3. 出願人が、指定官庁について不利にならない開示又は新規性の喪失についての例外に関する国内法の適用を請求するとき。

この場合は、「不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する陳述」と表示し、以下にその内容を記述する。

### 「第Ⅳ欄の続き」

11045 弁理士 内山 務 UCHIYAMA Tsutomu

〒532-0024 日本国大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号

武田薬品工業株式会社大阪工場内

c/o Osaka Plant of TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.

17-85, Jusohonmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka-shi,

OSAKA 532-0024 JAPAN



第Ⅵ欄 優先権主張		<input type="checkbox"/> 他の優先権の主張(先の出願)が追記欄に記載されている		
先の出願日 (日、月、年)	先の出願番号	先の出願		
		国内出願： 国 名	広域出願： *広域官庁名	国際出願： 受理官庁名
(1) 27. 08. 99	平成11年特許願 第241530号	日本国 Japan		
(2)				
(3)				

☒ 上記 ( ) の番号の先の出願(ただし、本国際出願が提出される受理官庁に対して提出されたものに限り)のうち、次の ( ) の番号のものについては、出願書類の認証謄本を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁(日本国特許庁の長官)に対して請求している。 (1)

\* 先の出願が、ARIPOの特許出願である場合には、その先の出願を行った工業所有権の保護のためのパリ条約同盟国の少なくとも1ヶ国を追記欄に表示しなければならない(規則4.10(b)(ii))。追記欄を参照。

### 第Ⅶ欄 国際調査機関

国際調査機関 (ISA) の選択	先の調査結果の利用請求; 当該調査の照会 (先の調査が、国際調査機関によって既に実施又は請求されている場合)
ISA/JP	出願日 (日、月、年)      出願番号      国名 (又は広域官庁)

### 第Ⅷ欄 照合欄 ; 出願の言語

この国際出願の用紙の枚数は次のとおりである。	この国際出願には、以下にチェックした書類が添付されている。
願書 . . . . . 5 枚 明細書 (配列表を除く) . . . . . 66 枚 請求の範囲 . . . . . 2 枚 要約書 . . . . . 1 枚 図面 . . . . . 5 枚 明細書の配列表 . . . . . 5 枚 合計 . . . . . 84 枚	1. <input checked="" type="checkbox"/> 手数料計算用紙 <input type="checkbox"/> 納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面 <input type="checkbox"/> 国際事務局の口座への振込みを証明する書面 2. <input type="checkbox"/> 別個の記名押印された委任状 3. <input checked="" type="checkbox"/> 包括委任状の写し 4. <input type="checkbox"/> 記名押印(署名)の説明書 5. <input type="checkbox"/> 優先権書類 (上記第Ⅵ欄の( ) の番号を記載する): 6. <input type="checkbox"/> 国際出願の翻訳文(翻訳に使用した言語名を記載する): 7. <input type="checkbox"/> 寄託した微生物又は他の生物材料に関する書面 8. <input checked="" type="checkbox"/> ヌクレオチド及び/又はアミノ酸配列表 (フレキシブルディスク) 9. <input checked="" type="checkbox"/> その他 (書類名を詳細に記載する): 陳述書、フレキシブルディスクの記録形式等の情報を記載した書面

要約書とともに提示する 図面:

本国際出願の使用言語名:

日本語

### IX欄 提出者の記名押印

各人の氏名 (名称) を記載し、その次に押印する。

高橋 秀一



内山 務



### 受理官庁記入欄

1. 国際出願として提出された書類の実際の受理の日	2. 図面 <input type="checkbox"/> 受理された <input type="checkbox"/> 不足図面がある
3. 国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であって その後期間内に提出されたものの実際の受理の日 (訂正日)	
4. 特許協力条約第11条(2)に基づき必要な補完の期間内の受理の日	
5. 出願人により特定された 国際調査機関      ISA/JP	
6. <input type="checkbox"/> 調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない	

### 国際事務局記入欄

記録原本の受理の日

様式 PCT/PO/101 (最終用紙) (1998年7月: 再版2000年1月)



P C

受理官庁記入欄

手数料計算用紙

願書附属書

国際出願番号

出願人又は代理人の書類記号

2633WO0P

受理官庁の日付印

出願人

武田薬品工業株式会社

所定の手数料の計算

1. 及び2. 特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律（国内法）

第18条第1項第1号の規定による手数料（注1）

（送付手数料 [T] 及び調査手数料 [S] の合計）

90,000 円 T+S

国際手数料（注2）

基本手数料

国際出願に含まれる用紙の枚数 84 枚

最初の30枚まで

40,700 円 b1

54 × 940 =

50,760 円 b2

30枚を越える用紙の枚数

用紙1枚の手数料

b1及びb2に記入した金額を加算し、合計額をBに記入

91,460 円 B

指定手数料

国際出願に含まれる指定数（注3） 66

8 × 8,800 =

70,400 円 D

支払うべき指定手数料  
の数（上限は8）

1指定当たりの手数料  
（円）

（注4）

B及びDに記入した金額を加算し、合計額をIに記入

161,860 円 I

4. 納付すべき手数料の合計

1+S及びIに記入した金額を加算し、合計額を合計に記入

251,860 円

合 計

（注1）送付手数料及び調査手数料については、合計金額を特許印紙をもって納付しなければならない。

（注2）国際手数料については、受理官庁である日本国特許庁の長官が告示する国際事務局の口座への振込を証明する書面を提出することにより納付しなければならない。

（注3）願書第V欄でレ印を付した □ の数。

（注4）指定数を記入する。ただし、8指定以上は一律8とする。



陳述書

特許庁長官殿

本書に添付したフレキシブルディスクに記録した塩基配列またはアミノ酸配列は、明細書に記載した塩基配列またはアミノ酸配列を忠実にコード化したものであって、内容を変更したものではないことを陳述します。

平成12年8月24日

国際出願の表示

24.08.00 提出の国際出願 (2633WO0P)

発明の名称

新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質およびそのDNA

代理人

氏 名 11404 弁理士 高橋 秀一

TAKAHASHI Shuichi



あて名 〒532-0024

日本国大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号

武田薬品工業株式会社大阪工場内

c/o Osaka Plant of TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.

17-85, Jusohonmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka-shi,

OSAKA 532-0024 JAPAN





フレキシブルディスクの記録形式等の情報を記載した書面

- 1 出願人名称  
武田薬品工業株式会社  
TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.
- 2 代理人氏名  
1 1 4 0 4 弁理士 高橋 秀一 TAKAHASHI Shuichi
- 3 国際出願の表示  
2 4 . 0 8 . 0 0 提出の国際出願 ( 2 6 3 3 W O O P )
- 4 発明の名称  
新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質およびそのDNA
- 5 使用した文字コード  
シフトJ I Sコード
- 6 配列を記録したファイル名  
2 6 3 3 . T X T
- 7 連絡先  
電話番号 0 6 - 6 3 0 0 - 6 7 8 6  
担当者氏名 内山 務



## 代理人選任証

29. 09. 1999

弁理士 高橋 秀一 殿

あて名 日本国大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号  
名称 武田薬品工業株式会社  
代表者 武田 國男



すべての国際出願に関する手続について、貴殿を代理人に選任したことに  
相違ありません。



## 包括委任状

12. 11. 97

私儀 弁理士 内山 務 を代理人と定めて、 特許協力条約に基づく  
すべての国際出願に関する一切の件を委任します。

あて名 日本国大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

名 称 武 田 薬 品 工 業 株 式 会 社

代表者 武 田 國 男





# 優先権証明願 (P C T)

特許庁長官殿

1. 事件の表示

平成11年特許願第241530号

2. 請求人

識別番号 100114041

住 所 大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号  
武田薬品工業株式会社 大阪工場内

氏 名 ふりがな 弁理士 たかはし 高橋 しゅういち 秀一



電話番号 03-3278-2235 (担当者 矢口)

3. 出願国名 P C T



(1,400円)







P C T

## 国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 28 MAY 2001

WIPO

PCT

出願人又は代理人 の書類記号 2633WOOP	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/05684	国際出願日 (日.月.年) 24.08.00	優先日 (日.月.年) 27.08.99
国際特許分類(IPC) Int.Cl <sup>7</sup> C12N 15/12, C12N 15/09, C07K 14/705, C07K 16/28, C12P 21/02, A61K 45/00, A61P 43/00, G01N 33/566, G01N 33/15, G01N 33/50		
出願人(氏名又は名称) 武田薬品工業株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。
- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で            ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 29.09.00	国際予備審査報告を作成した日 15.05.01	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関二丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員)  上 條 肇	4 N 9839
電話番号 03-3581-1101 内線 3488		



## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- |                          |            |         |        |                      |
|--------------------------|------------|---------|--------|----------------------|
| <input type="checkbox"/> | 明細書        | 第 _____ | ページ、   | 出願時に提出されたもの          |
|                          | 明細書        | 第 _____ | ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
|                          | 明細書        | 第 _____ | ページ、   | 付の書簡と共に提出されたもの       |
| <input type="checkbox"/> | 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | 出願時に提出されたもの          |
|                          | 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | PCT19条の規定に基づき補正されたもの |
|                          | 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
|                          | 請求の範囲      | 第 _____ | 項、     | 付の書簡と共に提出されたもの       |
| <input type="checkbox"/> | 図面         | 第 _____ | ページ/図、 | 出願時に提出されたもの          |
|                          | 図面         | 第 _____ | ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
|                          | 図面         | 第 _____ | ページ/図、 | 付の書簡と共に提出されたもの       |
| <input type="checkbox"/> | 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、   | 出願時に提出されたもの          |
|                          | 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、   | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
|                          | 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、   | 付の書簡と共に提出されたもの       |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)



## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	1 - 14	有
	請求の範囲		無
進歩性 (IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1 - 14	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1 - 14	有
	請求の範囲		無

## 2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

引用文献1: LIBERT, F. et al. "Selective amplification and cloning of four new members of the G protein-coupled receptor family", Science (1989), 第244巻, 第4904号, p. 569-572

引用文献2: EP, 877083, A (SMITHKLINE BEECHAM CORP.)  
11.11月.1998 (11.11.98) & JP, 11-75870, A

請求の範囲 1 - 14

引用文献1には、公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質において保存されている配列をもとにプライマーを作製し、該プライマーを用いてcDNAライブラリーから新規のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をクローニングしてDNA配列及びアミノ酸配列を決定したことが記載されている。

引用文献2には、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を同定する際に由来としてヒト脳を用いたことが記載されている。

ここで、引用文献2のようにヒト脳からG蛋白質共役型レセプター蛋白質を同定すること、この際に引用文献1に記載されたように公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質において保存されている配列をもとにプライマーを作製して新規のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を同定することは当業者が容易に想到し得たものと認められ、このようにして得られる新規なG蛋白質共役型レセプター蛋白質と比較して、本願において単離された特定のG蛋白質共役型レセプター蛋白質は格別予想もできない効果を奏するものとも認められない。

また、得られた蛋白質に対する抗体を作製すること、リガンドを決定すること、リガンドとの結合性をかえる化合物をスクリーニングすること等は当業者が必要に応じて適宜なし得たものと認める。

従って、請求の範囲1乃至14に係る発明は引用文献1及び2の記載に基づいて当業者が容易になし得たものと認める。



(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001年3月8日 (08.03.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/16316 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/12,  
15/09, C07K 14/705, 16/28, C12P 21/02, A61K 45/00,  
A61P 43/00, G01N 33/566, 33/15, 33/50

LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町  
四丁目1番1号 Osaka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/05684

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 渡辺 卓也  
(WATANABE, Takuya) [JP/JP]; 〒532-0033 大阪府大  
阪市淀川区新高6丁目14番9-B904号 Osaka (JP). 菊地  
久仁子 (KIKUCHI, Kuniko) [JP/JP]; 〒302-0024 茨城  
県取手市新町5丁目8-18-101号 Ibaraki (JP). 新谷 靖  
(SHINTANI, Yasushi) [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県つく  
ば市春日1丁目7番地9-703号 Ibaraki (JP).

(22) 国際出願日: 2000年8月24日 (24.08.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願平11/241530 1999年8月27日 (27.08.1999) JP

(74) 代理人: 弁理士 高橋秀一, 外 (TAKAHASHI, Shuichi  
et al.); 〒532-0024 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁  
目17番85号 武田薬品工業株式会社 大阪工場内 Osaka  
(JP).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品  
工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES,

/続葉有/

(54) Title: NOVEL G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR PROTEIN AND DNA THEREOF

(54) 発明の名称: 新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質およびそのDNA

(57) Abstract: A human-origin protein or its salt; a DNA encoding this protein; a method of determining a ligand to the above protein; a method/kit for screening compounds capable of altering the binding properties of the ligand to the protein; the compounds obtained by the screening or salts thereof; etc. The above-described human-origin protein or the DNA encoding the same can be used in: (1) determining a ligand to this protein; (2) preventives and/or remedies for diseases in association with the dysfunction of the above protein; (3) screening compounds (agonists, antagonists, etc.) capable of altering binding properties of the ligand to the protein; etc.

(57) 要約:

ヒト由来の蛋白質またはその塩、該蛋白質をコードするDNA、該蛋白質に  
対するリガンドの決定方法、リガンドと該蛋白質との結合性を変化させる化合  
物のスクリーニング方法/スクリーニング用キット、該スクリーニングで得ら  
れる化合物またはその塩などに関する。

本発明のヒト由来の蛋白質またはそれをコードするDNAは、(1) 本発明  
の蛋白質に対するリガンドの決定、(2) 本発明の蛋白質の機能不全に関連す  
る疾患の予防および/または治療剤、(3) 本発明の蛋白質とリガンドとの結  
合性を変化させる化合物 (アゴニスト、アンタゴニストなど) のスクリーニン  
グなどに用いることができる。

WO 01/16316 A1



(81) 指定国/国内: AE, AG, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, DZ, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MX, MZ, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA.

(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(84) 指定国/広域: ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PC7ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。



## 明細書

## 新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質およびそのDNA

## 5 技術分野

本発明は、ヒト脳由来の新規蛋白質（G蛋白質共役型レセプター蛋白質）またはその塩およびそれをコードするDNAなどに関する。

## 背景技術

- 10 多くのホルモンや神経伝達物質は、細胞膜に存在する特異的なレセプター蛋白質を通じて生体の機能を調節している。これらのレセプター蛋白質の多くは共役しているguanine nucleotide-binding protein（以下、G蛋白質と略称する場合がある）の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行ない、また7個の膜貫通領域を有する共通した構造をもっていることから、G蛋白質共役型レセ
- 15 プター蛋白質あるいは7回膜貫通型レセプター蛋白質と総称される。

G蛋白質共役型レセプター蛋白質は生体の細胞や臓器の各機能細胞表面に存在し、それら生体の細胞や臓器の機能を調節する分子、例えばホルモン、神経伝達物質および生理活性物質等の標的として非常に重要な役割を担っている。

- 各種生体の細胞や臓器の内の複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセ
- 20 プター蛋白質、特にG蛋白質共役型レセプター蛋白質との関係を明らかにすることは、各種生体の細胞や臓器の機能を解明し、それら機能と密接に関連した医薬品開発に非常に重要な手段を提供することとなる。

- 例えば、脳などの中枢神経系の器官では、多くのホルモン、ホルモン様物質、神経伝達物質あるいは生理活性物質などによる調節のもとで脳の生理的な機能
- 25 の調節が行なわれている。特に、神経伝達物質は脳内の様々な部位に存在し、それぞれに対応するレセプター蛋白質を通してその生理機能の調節を行っている。脳内には未だ未知の神経伝達物質も多く、そのレセプター蛋白質をコードするcDNAの構造に関しても、これまで報告されていないものも多いと考え

られる。さらに、既知のレセプター蛋白質のサブタイプが存在するかどうかについて分かっていなかった。

脳における複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプター蛋白質との関係を明らかにすることは、医薬品開発に非常に重要な手段である。また、レセプター蛋白質に対するアゴニスト、アンタゴニストを効率よくスクリーニングし、医薬品を開発するためには、脳内で発現しているレセプター蛋白質の遺伝子の機能を解明し、それらを適当な発現系で発現させることが必要であった。

近年、生体内で発現している遺伝子を解析する手段として、cDNAの配列をランダムに解析する研究が活発に行なわれており、このようにして得られたcDNAの断片配列がExpressed Sequence Tag (EST) としてデータベースに登録され、公開されている。しかし、多くのESTは配列情報のみであり、その機能を推定することは困難である。

#### 発明の開示

本発明は、ヒト脳由来の新規蛋白質（G蛋白質共役型レセプター蛋白質）、その部分ペプチドまたはそれらの塩、該蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNAを含有するDNA、該DNAを含有する組換えベクター、該組換えベクターで形質転換された形質転換体、該蛋白質またはその塩の製造法、該蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体、該蛋白質（G蛋白質共役型レセプター蛋白質）に対するリガンドの決定方法、リガンドと該蛋白質（G蛋白質共役型レセプター蛋白質）との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、該スクリーニング用キット、該スクリーニング方法もしくはスクリーニングキットを用いて得られるリガンドと該蛋白質（G蛋白質共役型レセプター蛋白質）との結合性を变化させる化合物またはその塩、およびリガンドと該蛋白質（G蛋白質共役型レセプター蛋白質）との結合性を变化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬などを提供する。

本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、ヒト脳由来の新規な蛋白質（G蛋白質共役型レセプター蛋白質）をコードするcDNAを単離し、全塩基配列を解

析することに成功した。そして、この塩基配列をアミノ酸配列に翻訳したところ、第1～第7膜貫通領域が疎水性プロット上で確認され、これらのcDNAにコードされる蛋白質が7回膜貫通型のG蛋白質共役型レセプター蛋白質であることを確認した(図3)。本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに

5 研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

- (1) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする蛋白質またはその塩、
- (2) 上記(1)記載の蛋白質の部分ペプチドまたはその塩、
- 10 (3) 上記(1)記載の蛋白質をコードするDNAを含有するDNA、
- (4) 配列番号：2で表される塩基配列を有する上記(3)記載のDNA、
- (5) 上記(3)記載のDNAを含有する組換えベクター、
- (6) 上記(5)記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、
- (7) 上記(6)記載の形質転換体を培養し、上記(1)記載の蛋白質を生成・
- 15 蓄積せしめることを特徴とする上記(1)記載の蛋白質またはその塩の製造法、
- (8) 上記(1)記載の蛋白質もしくは上記(2)記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、
- (9) 上記(1)記載の蛋白質もしくは上記(2)記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする上記(1)記載の蛋白質またはその塩に対する
- 20 リガンドの決定方法、
- (10) 上記(1)記載の蛋白質もしくは上記(2)記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とするリガンドと上記(1)記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- (11) 上記(1)記載の蛋白質もしくは上記(2)記載の部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とするリガンドと上記(1)記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キ
- 25 ト、
- (12) 上記(10)記載のスクリーニング方法または上記(11)記載のス

クリーニング用キットを用いて得られうる、リガンドと上記（１）記載の蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩、

- （１３）上記（１０）記載のスクリーニング方法または上記（１１）記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リガンドと上記（１）記載の蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、および

（１４）上記（３）記載のDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAなどを提供する。

より具体的には、

- （１５）蛋白質が、①配列番号：１で表わされるアミノ酸配列中の１または２個以上（好ましくは、１～３０個程度、より好ましくは１～９個程度、さらに好ましくは数個（１または２個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：１で表わされるアミノ酸配列に１または２個以上（好ましくは、１～３０個程度、より好ましくは１～１０個程度、さらに好ましくは数個（１または２個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：１で表わされるアミノ酸配列中の１または２個以上（好ましくは、１～３０個程度、より好ましくは１～１０個程度、さらに好ましくは数個（１または２個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質である上記（１）記載の蛋白質またはその塩、
- （１６）上記（１）記載の蛋白質もしくはその塩または上記（２）記載の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする上記（１０）記載のリガンドの決定方法、

- （１７）リガンドがアンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテスティナル アンド リレイテッド ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、

セチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーテ  
ィッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジ  
ン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 $\alpha$ および $\beta$ -ケモカイン  
（chemokine）（例えば、IL-8、GRO $\alpha$ 、GRO $\beta$ 、GRO $\gamma$ 、NAP-  
5 2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、  
MCP-3、I-309、MIP1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTESなど）、  
エンドセリン、エンテログastrin、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、  
パンクレアティックポリペプチドまたはガラニンである上記（9）記載のリ  
ガンドの決定方法、

10 （18）（i）上記（1）記載の蛋白質もしくはその塩または上記（2）記載  
の部分ペプチドもしくはその塩と、リガンドとを接触させた場合と、（ii）上  
記（1）記載の蛋白質もしくはその塩または上記（2）記載の部分ペプチドも  
しくはその塩と、リガンドおよび試験化合物とを接触させた場合との比較を行  
なうことを特徴とする上記（11）記載のスクリーニング方法、

15 （19）（i）標識したリガンドを上記（1）記載の蛋白質もしくはその塩ま  
たは上記（2）記載の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合と、（ii）  
標識したリガンドおよび試験化合物を上記（1）記載の蛋白質もしくはその塩  
または上記（2）記載の部分ペプチドまたはその塩に接触させた場合における、  
標識したリガンドの上記（1）記載の蛋白質もしくはその塩または上記（2）  
20 記載の部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定し、比較することを  
特徴とするリガンドと上記（1）記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化  
させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（20）（i）標識したリガンドを上記（1）記載の蛋白質を含有する細胞に  
接触させた場合と、（ii）標識したリガンドおよび試験化合物を上記（1）記  
25 載の蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、標識したリガンドの該  
細胞に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記（1）  
記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスク  
リーニング方法、

(2 1) (i) 標識したリガンドを上記(1)記載の蛋白質を含有する細胞の膜画分に接触させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび試験化合物を上記

(1) 記載の蛋白質を含有する細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞の膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記(1)記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(2 2) (i) 標識したリガンドを上記(6)記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現した蛋白質に接触させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび試験化合物を上記(6)記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現した蛋白質に接触させた場合における、標識したリガンドの該蛋白質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記(1)記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(2 3) (i) 上記(1)記載の蛋白質またはその塩を活性化する化合物を上記(1)記載の蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、(ii) 上記(1)記載の蛋白質またはその塩を活性化する化合物および試験化合物を上記(1)記載の蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、蛋白質を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記(1)記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(2 4) 上記(1)記載の蛋白質またはその塩を活性化する化合物を上記(6)記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現した蛋白質に接触させた場合と、上記(1)記載の蛋白質またはその塩を活性化する化合物および試験化合物を上記(6)記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現した蛋白質に接触させた場合における、該蛋白質を介する細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記(1)記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(25) 上記(1)記載の蛋白質を活性化する化合物が、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメ  
5 ジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP (バソアクティブ インテスティナル アンド リレイテッド ポリペプチド)、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP (カルシトニンジーンリレーティッドペプチド)、ロイコトリエン、  
パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、ア  
10 ドレナリン、 $\alpha$ および $\beta$ -ケモカイン (chemokine) (例えば、IL-8、GRO $\alpha$ 、GRO $\beta$ 、GRO $\gamma$ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTESなど)、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチドま  
15 たはガラニンである上記(23)または上記(24)記載のスクリーニング方法、

(26) 上記(18)～(25)記載のスクリーニング方法で得られうる、リガンドと上記(1)記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

20 (27) 上記(18)～(25)項記載のスクリーニング方法で得られうる、リガンドと上記(1)記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させるの化合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬、

(28) 上記(1)記載の蛋白質を含有する細胞を含有することを特徴とする  
上記(11)記載のスクリーニング用キット、

25 (29) 上記(1)記載の蛋白質を含有する細胞の膜画分を含有することを特徴とする上記(11)記載のスクリーニング用キット、

(30) 上記(6)記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現した蛋白質を含有することを特徴とする上記(11)記載のスク

リーニング用キット、

(31) 上記(28)～(30)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、リガンドと上記(1)記載の蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩、

- 5 (32) 上記(28)～(30)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、リガンドと上記(1)記載の蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬、

- (33) 上記(8)記載の抗体と、上記(1)記載の蛋白質もしくは上記(2)記載の部分ペプチドまたはその塩とを接触させることを特徴とする上記(1)記載の蛋白質もしくは上記(2)記載の部分ペプチドまたはその塩の定量法、
- 10 (34) 上記(8)記載の抗体と、被検液および標識化された上記(1)記載の蛋白質もしくは上記(2)記載の部分ペプチドまたはその塩とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された上記(1)記載の蛋白質もしくは上記(2)記載の部分ペプチドまたはその塩の割合を測定することを特徴とする被
- 15 検液中の上記(1)記載の蛋白質もしくは上記(2)記載の部分ペプチドまたはその塩の定量法、および

- (35) 被検液と担体上に不溶化した上記(8)記載の抗体および標識化された上記(8)項記載の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の上記(1)記載
- 20 の蛋白質もしくは上記(2)記載の部分ペプチドまたはその塩の定量法などを提供する。

#### 図面の簡単な説明

- 図1は実施例1で得られた本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするDNAの塩基配列(AQ27)、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す(図2
- 25 に続く)。

図2は実施例1で得られた本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするDNAの塩基配列(AQ27)、およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す(図1



の続き)。

図3は本発明のヒト脳由来蛋白質の疎水性プロットを示す。

図4は実施例2で行われたAQ27の発現組織分布の解析結果を示す。

図5は実施例3で行われたAQ27に対するMet-Enkephalin-Arg-Phe amideの反応性の解析結果を示す。縦軸はAcidification rate、横軸は測定サイクルを表わし、●は受容体発現CHO細胞の、○はmock細胞の反応性を示す。

#### 発明の実施をするための最良の形態

本発明の蛋白質（G蛋白質共役型レセプター蛋白質）は、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列〔図1～図2中のアミノ酸配列〕と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質である（以下、本発明の蛋白質（G蛋白質共役型レセプター蛋白質）またはその塩を本発明の蛋白質と略記する場合がある）。

本発明の蛋白質（G蛋白質共役型レセプター蛋白質）は、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）のあらゆる細胞（例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など）や血球系の細胞（例えば、MEL, M1, CTLL-2, HT-2, WEHI-3, HL-60, JOSK-1, K562, ML-1, MOLT-3, MOLT-4, MOLT-10, CCRF-CEM, TALL-1, Jurkat, CCRT-HSB-2, KE-37, SKW-3, HUT-78, HUT-102, H9, U937, THP-1, HEL, JK-1, CMK, KO-812, MEG-01など）、またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳

基底球、海馬、視床、視床下部、視床下核、大腦皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳梁、黒質)、脊髄、下垂体、胃、脾臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髓、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管(例、大腸、小腸)、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、末梢血球、前立腺、  
5 睪丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など(特に、脳や脳の各部位)に由来する蛋白質であってもよく、また合成蛋白質であってもよい。

配列番号: 1 で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号: 1 で表わされるアミノ酸配列と約 70% 以上、好ましくは約 80% 以上、より好ましくは約 90% 以上、さらに好ましくは約 95%  
10 以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

本発明の配列番号: 1 で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質としては、例えば、配列番号: 1 で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号: 1 で表わされるアミノ酸配列と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが好ましい。

15 実質的に同質の活性としては、例えば、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性が同等(例、約 0.5 ~ 2 倍)であることが好ましいが、これらの活性の程度や蛋白質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

20 リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性の測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、後述するリガンドの決定方法やスクリーニング方法に従って測定することができる。

また、本発明の蛋白質としては、①配列番号: 1 で表わされるアミノ酸配列中の 1 または 2 個以上(好ましくは、1 ~ 30 個程度、より好ましくは 1 ~ 1  
25 0 個程度、さらに好ましくは数個(1 または 2 個))のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号: 1 で表わされるアミノ酸配列に 1 または 2 個以上(好ましくは、1 ~ 30 個程度、より好ましくは 1 ~ 10 個程度、さらに好ましくは数個(1 または 2 個))のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号:

1 で表わされるアミノ酸配列中の 1 または 2 個以上（好ましくは、1 ～ 30 個程度、より好ましくは 1 ～ 10 個程度、さらに好ましくは数個（1 または 2 個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質なども用いられる。

- 5      本明細書における蛋白質は、ペプチド標記の慣例に従って左端が N 末端（アミノ末端）、右端が C 末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質をはじめとする本発明の蛋白質は、C 末端が通常カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）またはカルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）であるが、C 末端がアミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であつてもよい。

10      ここでエステルにおける R としては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくは n-ブチルなどの  $\text{C}_{1-6}$  アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの  $\text{C}_{3-8}$  シクロアルキル基、例えば、フェニル、 $\alpha$ -ナフチルなどの  $\text{C}_{6-12}$  アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- $\text{C}_{1-2}$  アルキル基もしくは  $\alpha$ -ナフチルメチルなどの  $\alpha$ -ナフチル- $\text{C}_{1-2}$  アルキル基などの  $\text{C}_{7-14}$  アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

20      本発明の蛋白質が C 末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明の蛋白質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記した C 末端のエステルなどが用いられる。

25      さらに、本発明の蛋白質には、上記した蛋白質において、N 末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの  $\text{C}_{2-6}$  アルカノイル基などの  $\text{C}_{1-6}$  アシル基など）で保護されているもの、N 端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの  $\text{C}_{2-6}$  アルカノイル基などの  $\text{C}_{1-6}$  アシル基など）で保

護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。

本発明の蛋白質の具体例としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するヒト由来（より好ましくはヒト脳由来）の蛋白質などがあげられる。

本発明の蛋白質の部分ペプチド（以下、部分ペプチドと略記する場合がある）としては、前記した本発明の蛋白質の部分ペプチドであれば何れのものであってもよいが、例えば、本発明の蛋白質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位であって、レセプター結合活性を有するものなどが用いられる。

具体的には、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有する蛋白質の部分ペプチドとしては、〔図3〕で示される疎水性プロット解析において細胞外領域（親水性（Hydrophilic）部位）であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性（Hydrophobic）部位を一部に含むペプチドも同様に用いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。本発明の部分ペプチドのアミノ酸の数は、前記した本発明の蛋白質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、より好ましくは100個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが好ましい。

実質的に同一のアミノ酸配列とは、これらアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を示す。

ここで、「実質的に同質の活性」とは、前記と同意義を示す。「実質的に同質の活性」の測定は前記と同様に行なうことができる。

また、本発明の部分ペプチドは、上記アミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列中の1または

2個以上（好ましくは、1～10個程度、より好ましくは1～5個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてよい。

また、本発明の部分ペプチドはC末端が通常カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）  
5 またはカルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）であるが、前記した本発明の蛋白質のごとく、C末端がアミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であってもよい。

さらに、本発明の部分ペプチドには、前記した本発明の蛋白質と同様に、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生  
10 体内で切断され生成したGlnがピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

また、本発明の部分ペプチドはC末端が通常カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）  
またはカルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）であるが、前記した本発明の蛋白質のご  
15 とく、C末端がアミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であってもよい。

本発明の蛋白質またはその部分ペプチドの塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、  
20 ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明の蛋白質またはその塩は、前述したヒトや哺乳動物の細胞または組織から自体公知の蛋白質の精製方法によって製造することもできるし、後述する  
25 本発明の蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述の蛋白質合成法またはこれに準じて製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織

または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせるにより精製単離することができる。

本発明の蛋白質、その部分ペプチドもしくはそれらの塩またはそれらのアミド体の合成には、通常市販の蛋白質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-  
5 (2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-  
10 (2',4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 $\alpha$ -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とする蛋白質の配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂から蛋白質を切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成  
15 反応を実施し、目的の蛋白質またはそれらのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、蛋白質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt、HOOBt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOOBt  
20 エステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

25 保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、蛋白質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N,N'-ジメチルホルムアミド、N,N'-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化

炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度は蛋白質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約 $-20^{\circ}\text{C}$ ～ $50^{\circ}\text{C}$ の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することができる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、ターシャリーベンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

カルボキシ基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ターシャリーブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、ターシャリーブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられ

る。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl<sub>2</sub>-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、ターシャリーブチルなどが用いられる。

- 5 ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

- 原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、  
10 2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

- 保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素な  
15 どの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、  
20 一般に約-20℃～40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除  
25 去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。



原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

蛋白質のアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端  
5 アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（蛋白質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の $\alpha$ -アミノ基の保護基のみを除いた蛋白質とC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去した蛋白質とを製造し、この両蛋白質を上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた  
10 保護蛋白質を精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗蛋白質を得ることができる。この粗蛋白質は既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望の蛋白質のアミド体を得ることができる。

蛋白質のエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、蛋白質のアミド体と同様にして、所望の蛋白質のエステル体を得ることができる。

本発明の蛋白質の部分ペプチドまたはその塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明の蛋白質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成  
20 法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明の蛋白質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

25 ①M. Bodanszky および M. A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

②SchroederおよびLuebke、ザ ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

④矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、蛋白質の化学IV、205、(1977年)

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

5       また、反応後は通常の精製法、たとえば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

10       本発明の蛋白質をコードするDNAとしては、前述した本発明の蛋白質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・  
15       組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する)によって増幅することもできる。

      具体的には、本発明の蛋白質をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：2で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAを有し、本発明の蛋白質と実質的に同質の活性(例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など)を有する蛋白質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

25       配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、例えば、配列番号：2で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有

するDNAなどが用いられる。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約 19 ~ 40 mM、好ましくは約 19 ~ 20 mM で、温度が約 50 ~ 70 °C、好ましくは約 60 ~ 65 °C の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約 19 mM で温度が約 65 °C の場合が最も好ましい。

より具体的には、配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：2 で表わされる塩基配列を有するDNAがあげられる。

本発明の蛋白質をコードする塩基配列を含有する、または該塩基配列と相補的な塩基配列の一部を含有してなるヌクレオチド (オリゴヌクレオチド) とは、本発明の蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNAを包含するだけでなく、RNAをも包含する意味で用いられる。

本発明に従えば、本発明の蛋白質遺伝子の複製又は発現を阻害することのできるアンチセンス・ (オリゴ) ヌクレオチド (核酸) を、クローン化したあるいは決定された蛋白質をコードする塩基配列の塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。そうした (オリゴ) ヌクレオチド (核酸) は、G 蛋白質共役型蛋白質遺伝子のRNAとハイブリダイズすることができ、該RNAの合成又は機能を阻害することができるか、あるいはG 蛋白質共役型蛋白質関連RNAとの相互作用を介してG 蛋白質共役型蛋白質遺伝子の発現を調節・制御することができる。G 蛋白質共役型蛋白質関連RNAの選択された配列に相補的な (オリゴ) ヌクレオチド、及びG 蛋白質共役型蛋白質関連RNAと特異的にハイブリダイズすることができる (オリゴ) ヌクレオチドは、生体内及び生体外でG蛋

白質共役型蛋白質遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療又は診断に有用である。

用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列又は核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列又は核酸とペプチド（蛋白質）との間で「対応する」とは、ヌクレオチド（核酸）の配列又はその相補体から誘導される指令にあるペプチド（蛋白質）のアミノ酸を通常指している。G蛋白質共役型蛋白質遺伝子の5'端ヘアピンループ、5'端6-ベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、蛋白質コード領域、ORF翻訳開始コドン、3'端非翻訳領域、3'端パリンδροーム領域、及び3'端ヘアピンループは好ましい対象領域として選択しうるが、G蛋白質共役型蛋白質遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的な（オリゴ）ヌクレオチドとの関係は、対象物とハイブリダイズすることができる（オリゴ）ヌクレオチドとの関係は、「アンチセンス」であるということができる。アンチセンス・（オリゴ）ヌクレオチドは、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリデオキシヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリデオキシヌクレオチド、プリン又はピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販の蛋白質核酸及び合成配列特異的な核酸ポリマー）又は特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリナグや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、2本鎖DNA、1本鎖DNA、2本鎖RNA、1本鎖RNA、さらにDNA:RNAハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド又は非修飾オリゴヌクレオチド、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電

結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合又は硫黄含有結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、例えば蛋白質（ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリーラーリジンなど）や糖（例えば、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレント化合物（例えば、アクリジン、プソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、 $\alpha$ アノマー型の核酸など）であってよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」及び「核酸」とは、プリン及びピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。こうした修飾物は、メチル化されたプリン及びピリミジン、アシル化されたプリン及びピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオチド及び修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

本発明のアンチセンス核酸は、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定されるものではない。本発明のアンチセンス核酸は次のような方針で好ましく設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンス核酸の毒性をより小さなものにする。

こうして修飾は当該分野で数多く知られており、例えば J. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp. 247, 1992; Vol. 8, pp. 395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993 などに

開示がある。

本発明のアンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していて良く、リボゾーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホスホリッピド、コレステロールなど）といった粗水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、コレステリルクロロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核酸の3'端あるいは5'端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができる。その他の基としては、核酸の3'端あるいは5'端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNaseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

アンチセンス核酸の阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいは蛋白質の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。該核酸其れ自体公知の各種の方法で細胞に適用できる。

本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、RT-PCR法と略称する）

によって増幅することもできる。

具体的には、本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または②配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNAとハイストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNAを有し、本発明の蛋白質ペプチドと実質的に同質の活性（例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有する蛋白質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNAとハイストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、例えば、配列番号：2で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上、なかでも好ましくは約98%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

本発明の蛋白質またはその部分ペプチド（以下、本発明の蛋白質と略記する）を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明の蛋白質の部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明の蛋白質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したもののハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

DNAの塩基配列の変換は、PCRや公知のキット、例えば、Mutan<sup>TM</sup>-super Express Km（宝酒造（株））、Mutan<sup>TM</sup>-K（宝酒造（株））等を用いて、ODA-LA PCR法、Gapped duplex法やKunkel法等の自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化された蛋白質をコードするDNAは目的によりそのまま、または

所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明の蛋白質の発現ベクターは、例えば、(イ)本発明の蛋白質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110, pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19, pSH15)、 $\lambda$ ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, pcDNA1/Neoなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SR $\alpha$ プロモーター、SV40プロモーター、HIV-LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。

これらのうち、CMVプロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 $\lambda$ P<sub>L</sub>プロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロ



モーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシング  
シグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、  
SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いること  
5 ができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、d  
hfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、  
アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp<sup>r</sup>と略称する場合がある）、ネオマイ  
シン耐性遺伝子（以下、Neo<sup>r</sup>と略称する場合がある、G418耐性）等が  
挙げられる。特に、CHO（dhfr<sup>-</sup>）細胞を用いてdhfr遺伝子を選択  
10 マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっ  
ても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明の蛋白質のN端  
末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、  
OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 $\alpha$ -アミラー  
15 ゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場  
合は、MF $\alpha$ ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞  
である場合には、インシュリン・シグナル配列、 $\alpha$ -インターフェロン・シグ  
ナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明の蛋白質をコードするDNAを含有するベ  
20 クターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、  
昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）  
K12・DH1〔プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ  
25 ブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー（Proc. Natl. Acad. Sci. US  
A）, 60巻, 160（1968）〕, JM103〔ヌクイレック・アシッズ・  
リサーチ,（Nucleic Acids Research）, 9巻, 309（1981）〕, JA2  
21〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー（Journal of Molecular

Biology) ] , 120 巻, 517 (1978) ] , HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41 巻, 459 (1969) ] , C600 [ジェネティックス (Genetics) , 39 巻, 440 (1954) ] などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サチルス (*Bacillus subtilis*)  
5 MI114 [ジーン, 24 巻, 255 (1983) ] , 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (*Journal of Biochemistry*) , 95 巻, 87 (1984) ] などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R<sup>-</sup>, NA87-11A, DKD-5D, 2  
10 OB-12, シゾサッカロマイセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913, NCYC2036, ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell ; Sf細胞) 、*Trichoplusia ni*  
15 の中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh Five<sup>TM</sup>細胞、*Mamestra brassicae*由来の細胞または*Estigmena acrea*由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N ; BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711) 、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L. ら、イン・ヴィボ (In Vivo) , 13,  
20 213-217, (1977)) などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる [前田ら、ネイチャー (Nature) , 315 巻, 592 (1985) ] 。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記) , dhfr 遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO (dhfr<sup>-</sup>) 細胞と略記) ,  
25 マウスL細胞, マウスAtT-20, マウスミエローマ細胞, ラットGH3, ヒトFL細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・

ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110(1972)やジーン (Gene), 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なうことができる。バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、メソズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 194巻, 182-187(1991)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929(1978)などに記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ／テクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55(1988)などに記載の方法に従って行なうことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8 新 細胞工学実験プロトコル, 263-267(1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology), 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、G蛋白質共役型蛋白質をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得られる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母、ビタミン類、生長促進

因子などを添加してもよい。培地のpHは約5～8が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller) , ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in  
5 Molecular Genetics) , 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3β-インドリル アクリル酸のような薬剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地〔Bostian, K. L. ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユー  
15 エスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 77巻, 4505(1980)〕や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地〔Bitter, G. A. ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユー  
ユエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 81巻, 5330(198  
20 4)〕が挙げられる。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃～35℃で約24～72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T. C. C., ネイチャー (Nature) , 195, 788(1962))  
25 に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2～6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3～5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約

5 5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地〔サイエンス (Science), 122巻, 501(1952)], DMEM培地〔ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396(1959)], RPMI 1640培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メ  
ディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical  
5 Association) 199巻, 519(1967)], 199培地〔プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(1950)]などが用いられる。pHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30℃～40℃で約15～60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

10 以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明のG蛋白質共役型蛋白質を生成せしめることができる。

上記培養物から本発明の蛋白質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

本発明の蛋白質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、  
15 公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過により蛋白質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100<sup>TM</sup>などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中に蛋白質が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれる蛋白質の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用す  
25 る方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィー

などの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

かくして得られる蛋白質が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合  
5 合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生する蛋白質を、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモ  
10 トリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

かくして生成する本発明の蛋白質またはその塩の活性は、標識したリガンドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

15 本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体は、本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩（以下、本発明の蛋白質等と略記する）に対する抗体は、本発明の蛋白質等を抗原として用い、自体  
20 公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

〔モノクローナル抗体の作製〕

（a）モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明の蛋白質等は、哺乳動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能  
25 を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行なわれる。用いられる哺乳動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギが挙げられるが、マウスおよびラットが

好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、例えば、マウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化した本発明の蛋白質等と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256巻、495頁(1975年)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0などが挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1：1～20：1程度であり、PEG（好ましくは、PEG1000～PEG6000）が10～80%程度の濃度で添加され、約20～40℃、好ましくは約30～37℃で約1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、本発明の蛋白質等抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識した本発明の蛋白質等を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って

行なうことができるが、通常はHAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地などで行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））またはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、

5   日本製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイ

10  ブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

#### （b）モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点

15  沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相またはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

#### 〔ポリクローナル抗体の作製〕

20  本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法にしたがって製造することができる。例えば、免疫抗原（本発明の蛋白質等抗原）とキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に哺乳動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明の蛋白質等に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造できる。

25  哺乳動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブ



ミン、ウシサイログロブリン、キーホール・リンペット・ヘモシアニン等を重量比でハプテン 1 に対し、約 0.1 ~ 20、好ましくは約 1 ~ 5 の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約 2 ~ 6 週毎に 1 回ずつ、計約 3 ~ 10 回程度行なうことができる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された哺乳動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、およびそれらをコードする DNA は、①本発明の蛋白質に対するリガンドの決定方法、②抗体および抗血清の入手、③組換え型蛋白質の発現系の構築、④同発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、⑤構造的に類似したリガンド・レセプターとの比較にもとづいたドラッグデザインの実施、⑥遺伝子診断におけるプローブや PCR プライマーを作成するための試薬、⑦トランスジェニック動物の作製または⑧遺伝子予防・治療剤等の医薬などとして用いることができる。

特に、本発明の組換え型蛋白質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、ヒトや哺乳動物に特異的な G 蛋白質共役型レセプター

に対するリガンドの結合性を变化させる化合物（例、アゴニスト、アンタゴニストなど）をスクリーニングすることができ、該アゴニストまたはアンタゴニストを各種疾病の予防・治療剤などとして使用することができる。

5 本発明の蛋白質、部分ペプチドまたはそれらの塩（以下、本発明の蛋白質等と略記する場合がある）、本発明の蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）および本発明の蛋白質等に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）の用途について、以下に具体的に説明する。

#### （１）本発明の蛋白質に対するリガンド（アゴニスト）の決定方法

10 本発明の蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩は、本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンド（アゴニスト）を探索し、または決定するための試薬として有用である。

すなわち、本発明は、本発明の蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする本発明  
15 の蛋白質に対するリガンドの決定方法を提供する。

試験化合物としては、公知のリガンド（例えば、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP  
20 （バソアクティブ インテスティナル アンド リレイテッド ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 $\alpha$ および $\beta$ -ケモカイン（chemokine）（例えば、IL-8、GRO $\alpha$ 、GRO $\beta$ 、GRO $\gamma$ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTESなど）、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒス  
25

タミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチドまたはガラニンなどがあげられ、またその他に、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ブタ、ウシ、ヒツジ、サルなど）の組織抽出物、細胞培養上清などが用いられる。例えば、該組織抽出物、細胞培養上清などを本発明の蛋白質に添加し、細胞刺激活性などを測定しながら分画し、最終的に単一のリガンドを得ることができる。

具体的には、本発明のリガンド決定方法は、本発明の蛋白質、その部分ペプチドもしくはそれらの塩を用いるか、または組換え型蛋白質の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、本発明の蛋白質に結合して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性）を有する化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩を決定する方法である。

本発明のリガンド決定方法においては、本発明の蛋白質またはその部分ペプチドと試験化合物とを接触させた場合の、例えば、該蛋白質または該部分ペプチドに対する試験化合物の結合量や、細胞刺激活性などを測定することを特徴とする。

- より具体的には、本発明は、①標識した試験化合物を、本発明の蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合における、標識した試験化合物の該蛋白質もしくはその塩、または該部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定することを特徴とする本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、
- ②標識した試験化合物を、本発明の蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した試験化合物の該細胞または該膜画分に対する結合量を測定することを特徴とする本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、

- ③ 標識した試験化合物を、本発明の蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した蛋白質に接触させた場合における、標識した試験化合物の該蛋白質またはその塩に対する結合量を測定することを特徴とする本発明の蛋白質に対するリガンドの決定方法、
- 5 ④ 試験化合物を、本発明の蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、蛋白質を介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とする本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、および
- 10 ⑤ 試験化合物を、本発明の蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した蛋白質に接触させた場合における、蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とする本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法を提供する。
- 15 ⑤ 試験化合物を、本発明の蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した蛋白質に接触させた場合における、蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とする本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法を提供する。
- 20 特に、上記①～③の試験を行ない、試験化合物が本発明の蛋白質に結合することを確認した後に、上記④～⑤の試験を行なうことが好ましい。
- まず、リガンド決定方法に用いる蛋白質としては、前記した本発明の蛋白質または本発明の部分ペプチドを含有するものであれば何れのものであってもよいが、動物細胞を用いて大量発現させた蛋白質が適している。
- 25 本発明の蛋白質を製造するには、前述の発現方法が用いられるが、該蛋白質をコードするDNAを哺乳動物細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことが好ましい。目的とする蛋白質部分をコードするDNA断片には、通常、相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、

遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。本発明の蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus ; NPV) のポリヘドリンプロモーター、SV 40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献 [Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.) , 267巻, 19555~19559頁, 1992年] に記載の方法に従って行うことができる。

したがって、本発明のリガンド決定方法において、本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩を含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製した蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩であってもよいし、該蛋白質を含有する細胞またはその細胞膜画分を用いてもよい。

本発明のリガンド決定方法において、本発明の蛋白質を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行なうことができる。

本発明の蛋白質を含有する細胞としては、本発明の蛋白質を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが用いられる。

細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica社製) による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速 (500

rpm $\sim$ 3000 rpm)で短時間(通常、約1分 $\sim$ 10分)遠心し、上清をさらに高速(15000 rpm $\sim$ 30000 rpm)で通常30分 $\sim$ 2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現した蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

- 5     該蛋白質を含有する細胞やその膜画分中の蛋白質の量は、1細胞当たり $10^3\sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5\sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性(比活性)が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。
- 10    本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンドを決定する前記の① $\sim$ ③の方法を実施するためには、適当な蛋白質画分と、標識した試験化合物が必要である。

- 蛋白質画分としては、天然型のレセプター蛋白質画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型レセプター画分などが望ましい。ここで、同等の活性
- 15    とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。

- 標識した試験化合物としては、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識したアンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グル
- 20    カゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP(バソアクティブ インテスティナル アンド リイテッド ポリペプチド)、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP(カルシトニンジーンリレーティッドペプチド)、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、
- 25    トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 $\alpha$ および $\beta$ -ケモカイン(chemokine)(例えば、IL-8、GRO $\alpha$ 、GRO $\beta$ 、GRO $\gamma$ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTESなど)、

エンドセリン、エンテログastrin、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、  
パankレアティックポリペプチド、ガラニンなどが好適である。

具体的には、本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法を行  
なうには、まず本発明の蛋白質を含有する細胞または細胞の膜画分を、決定方  
5 法に適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッ  
ファーには、pH 4～10（望ましくはpH 6～8）のリン酸バッファー、ト  
リスー塩酸バッファーなどのリガンドと本発明の蛋白質との結合を阻害しない  
バッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、  
CHAPS、Tween-80<sup>TM</sup>（花王ーアトラス社）、ジギトニン、デオキ  
10 シコレートなどの界面活性剤やウシ血清アルブミンやゼラチンなどの各種蛋白  
質をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるリセプタ  
ーやリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64（ペプ  
チド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもで  
きる。0.01ml～10mlの該レセプター溶液に、一定量（5000cpm  
15 ～500000cpm）の $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで  
標識した試験化合物を共存させる。非特異的結合量（NSB）を知るために大  
過剰の未標識の試験化合物を加えた反応チューブも用意する。反応は約0℃か  
ら50℃、望ましくは約4℃から37℃で、約20分から24時間、望ましく  
は約30分から3時間行なう。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同  
20 バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレ  
ーションカウンターあるいはγ-カウンターで計測する。全結合量（B）から  
非特異的結合量（NSB）を引いたカウント（B-NSB）が0cpmを越え  
る試験化合物を本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンド（アゴニスト）  
として選択することができる。

25 本発明の蛋白質またはその塩に対するリガンドを決定する前記の④～⑤の方  
法を実施するためには、該蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン  
酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞  
内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質の

- リン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、本発明の蛋白質を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。リガンド決定を行なうにあたっては前もって新鮮な培地
- 5 あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質(例えば、アラキドン酸など)の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行
- 10 なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

- 本発明の蛋白質またはその塩に結合するリガンド決定用キットは、本発明の蛋白質もしくはその塩、本発明の部分ペプチドもしくはその塩、本発明の蛋白質
- 15 質を含有する細胞、または本発明の蛋白質を含有する細胞の膜画分などを含有するものである。

本発明のリガンド決定用キットの例としては、次のものが挙げられる。

#### 1. リガンド決定用試薬

##### ①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

- 20 Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製)に、0.05%のウシ血清アルブミン(シグマ社製)を加えたもの。

孔径0.45  $\mu$ mのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

##### ②G蛋白質共役型レセプター蛋白質標品

- 25 本発明の蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに $5 \times 10^5$ 個/穴で継代し、37℃、5%CO<sub>2</sub>、95%airで2日間培養したもの。

##### ③標識試験化合物

市販の[<sup>3</sup>H]、[<sup>125</sup>I]、[<sup>14</sup>C]、[<sup>35</sup>S]などで標識した化合物、



または適当な方法で標識化したもの

水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1  $\mu$ Mに希釈する。水に難溶性を示す試験化合物については、ジメチルホルムアミド、DMSO、メタノール等に溶解する。

5 ④非標識試験化合物

標識化合物と同じものを100～1000倍濃い濃度に調製する。

2. 測定法

①12穴組織培養用プレートにて培養した本発明の蛋白質発現CHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490  $\mu$ lの測定用緩衝液を各穴に加える。

②標識試験化合物を5  $\mu$ l加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには非標識試験化合物を5  $\mu$ l加えておく。

③反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識試験化合物を0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA（和光純薬製）と混合する。

④液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定する。

本発明の蛋白質またはその塩に結合することができるリガンドとしては、例えば、脳、下垂体、脾臓などに特異的に存在する物質などが挙げられ、具体的には、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテスティナル アン  
ド リレイテッド ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 $\alpha$ および $\beta$ -ケモカイン（chemokine）

(例えば、IL-8、GRO $\alpha$ 、GRO $\beta$ 、GRO $\gamma$ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTESなど)、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニンなどが用いられる。

## (2) 本発明の蛋白質欠乏症の予防・治療剤

上記(1)の方法において、本発明の蛋白質に対するリガンドが明らかになれば、該リガンドが有する作用に応じて、①本発明の蛋白質または②該蛋白質をコードするDNAを、本発明の蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および/または治療剤などの医薬として使用することができる。

例えば、生体内において本発明の蛋白質が減少しているためにリガンドの生理作用が期待できない(該蛋白質の欠乏症)患者がいる場合に、①本発明の蛋白質を該患者に投与し該蛋白質の量を補充したり、②(イ)本発明の蛋白質をコードするDNAを該患者に投与し発現させることによって、あるいは(ロ)対象となる細胞に本発明の蛋白質をコードするDNAを挿入し発現させた後に、該細胞を該患者に移植することなどによって、患者の体内における蛋白質の量を増加させ、リガンドの作用を十分に発揮させることができる。したがって、本発明の蛋白質をコードするDNAは、安全で低毒性な本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および/または治療剤などの医薬として有用である。

本発明の蛋白質または本発明のDNAは中枢疾患(例えばアルツハイマー病・痴呆・摂食障害(拒食症)・てんかんなど)、ホルモン系の疾患(例えば、微弱陣痛、弛緩出血、胎盤娩出前後、子宮復古不全、帝王切開術、人工妊娠中絶、乳汁うっ滞など)、肝/胆/膵/内分泌疾患(例えば糖尿病・摂食障害など)、炎症性疾患(アレルギー・喘息・リュウマチなど)、循環器疾患(例えば高血圧症・心肥大・狭心症・動脈硬化等)の予防および/または治療に有用である。

本発明の蛋白質を上記予防・治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

一方、本発明の蛋白質をコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）を上記予防・治療剤として使用する場合は、本発明のDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、  
5 常套手段に従って実施することができる。本発明のDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

例えば、①本発明の蛋白質または②該蛋白質をコードするDNAは、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、①本発明の蛋白質または②該蛋白質をコードするDNAを生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和すること  
15 によって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油など  
20 のような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例え

ば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート 80™、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

本発明の蛋白質またはDNAの投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（60 kgとして）の拒食症患者においては、一日につき約0.1 mg～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常成人（60 kgとして）の拒食症患者においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kgあたりに換算した量を投与することができる。

### （3）遺伝子診断剤

本発明のDNAは、プローブとして使用することにより、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）における本発明の蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNAまたはm

RNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。

本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザン  
5 ハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（ゲノミックス（Genomics）,  
第5巻、874～879頁（1989年）、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナ  
ショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ユエスエー（Proceedings  
of the Natinal Academy of Sciences of the United States of America）,  
第86巻、2766～2770頁（1989年））などにより実施することが  
10 できる。

#### （4）本発明の蛋白質に対するリガンドの定量法

本発明の蛋白質等は、リガンドに対して結合性を有しているので、生体内に  
おけるリガンド濃度を感度良く定量することができる。

本発明の定量法は、例えば、競合法と組み合わせることによって用いること  
15 ができる。すなわち、被検体を本発明の蛋白質等と接触させることによって被  
検体中のリガンド濃度を測定することができる。具体的には、例えば、以下の  
①または②などに記載の方法あるいはそれに準じる方法に従って用いることが  
できる。

①入江寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和49年発行）

20 ②入江寛編「続ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和54年発行）

#### （5）本発明の蛋白質とリガンドとの結合性を变化させる化合物のスクリー ニング方法

本発明の蛋白質等を用いるか、または組換え型蛋白質等の発現系を構築し、  
該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、リガンド  
25 と本発明の蛋白質等との結合性を变化させる化合物（例えば、ペプチド、蛋白  
質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩を効率  
よくスクリーニングすることができる。

このような化合物には、（イ）G蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激

- 活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を有する化合物（いわゆる、本発明の蛋白質に対するアゴニスト）、（ロ）該細胞刺激活性を有しない化合物（いわゆる、本発明の蛋白質に対するアンタゴニスト）、（ハ）リガンドと本発明の蛋白質との結合力を増強する化合物、あるいは（ニ）リガンドと本発明の蛋白質との結合力を減少させる化合物などが含まれる（なお、上記（イ）の化合物は、前記したリガンド決定方法によってスクリーニングすることが好ましい）。
- すなわち、本発明は、（i）本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩と、リガンドとを接触させた場合と（ii）本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩と、リガンドおよび試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするリガンドと本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のスクリーニング方法においては、（i）と（ii）の場合における、例えば、該蛋白質等に対するリガンドの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較することを特徴とする。

より具体的には、本発明は、

- ①標識したリガンドを、本発明の蛋白質等に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明の蛋白質等に接触させた場合における、標識したリガンドの該蛋白質等に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明の蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- ②標識したリガンドを、本発明の蛋白質等を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明の蛋白質等を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特

徴とするリガンドと本発明の蛋白質等との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

- ③標識したリガンドを、本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した蛋白質等に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明の蛋白質等に接触させた場合における、標識したリガンドの該蛋白質等に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明の蛋白質等との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- ④本発明の蛋白質等を活性化する化合物（例えば、本発明の蛋白質等に対するリガンドなど）を本発明の蛋白質等を含有する細胞に接触させた場合と、本発明の蛋白質等を活性化する化合物および試験化合物を本発明の蛋白質等を含有する細胞に接触させた場合における、レセプターを介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明の蛋白質等との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および
- ⑤本発明の蛋白質等を活性化する化合物（例えば、本発明の蛋白質等に対するリガンドなど）を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明の蛋白質等に接触させた場合と、本発明の蛋白質等を活性化する化合物および試験化合物を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明の蛋白質等に接触させた場合における、レセプターを介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）

を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明の蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明の蛋白質等が得られる以前は、G蛋白質共役型レセプターアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングする場合、まずラットなどのG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含む細胞、組織またはその細胞膜画分を用いて候補化合物を得て（一次スクリーニング）、その後該候補化合物が実際にヒトのG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合を阻害するか否かを確認する試験（二次スクリーニング）が必要であった。細胞、組織または細胞膜画分をそのまま用いれば他のレセプター蛋白質も混在するために、目的とするレセプター蛋白質に対するアゴニストまたはアンタゴニストを実際にスクリーニングすることは困難であった。

しかしながら、例えば、本発明のヒト由来蛋白質を用いることによって、一次スクリーニングの必要がなくなり、リガンドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物を効率良くスクリーニングすることができる。さらに、スクリーニングされた化合物がアゴニストかアンタゴニストかを簡単に評価することができる。

本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

まず、本発明のスクリーニング方法に用いる本発明の蛋白質等としては、前記した本発明の蛋白質等を含有するものであれば何れのものであってもよいが、本発明の蛋白質等を含有する哺乳動物の臓器の細胞膜画分が好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大量発現させたヒト由来のレセプター蛋白質等などが適している。

本発明の蛋白質等を製造するには、前述の方法が用いられるが、本発明のDNAを哺乳細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことが好ましい。目的とする蛋白質部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。本発明の蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、



それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus ; NPV) のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショック  
5 プロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献 [Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.) , 267巻, 19555 ~19559頁, 1992年] に記載の方法に従って行なうことができる。

10 したがって、本発明のスクリーニング方法において、本発明の蛋白質等を含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製した蛋白質等であってもよいし、該蛋白質等を含有する細胞を用いてもよく、また該蛋白質等を含有する細胞の膜画分を用いてもよい。

本発明のスクリーニング方法において、本発明の蛋白質等を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行なうことができる。

本発明の蛋白質等を含有する細胞としては、該蛋白質等を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが好ましい。

20 細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica社製) のよる破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速 (500  
25 rpm ~ 3000 rpm) で短時間 (通常、約1分 ~ 10分) 遠心し、上清をさらに高速 (15000 rpm ~ 30000 rpm) で通常30分 ~ 2時間遠

心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現した蛋白質等と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

該蛋白質等を含有する細胞や膜画分中の該蛋白質の量は、1細胞当たり  $10^3 \sim 10^8$  分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$  分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

リガンドと本発明の蛋白質等との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする前記の①～③を実施するためには、例えば、適当な蛋白質画分と、標識したリガンドが必要である。

蛋白質画分としては、天然型のレセプター蛋白質画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型レセプター蛋白質画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。

標識したリガンドとしては、標識したリガンド、標識したリガンドアナログ化合物などが用いられる。例えば  $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$  などで標識されたりガンドなどが用いられる。

具体的には、リガンドと本発明の蛋白質等との結合性を変化させる化合物のスクリーニングを行なうには、まず本発明の蛋白質等を含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することにより蛋白質標品を調製する。バッファーには、pH 4～10（望ましくはpH 6～8）のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドと蛋白質との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80<sup>TM</sup>（花王-アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml～10mlの該レセプター溶液に、一定量（5000cpm～500000cpm）の標識し

たりガンドを添加し、同時に  $10^{-4}\text{M} \sim 10^{-10}\text{M}$  の試験化合物を共存させる。非特異的結合量 (NSB) を知るために大過剰の未標識のリガンドを加えた反応チューブも用意する。反応は約  $0^{\circ}\text{C}$  から  $50^{\circ}\text{C}$ 、望ましくは約  $4^{\circ}\text{C}$  から  $37^{\circ}\text{C}$  で、約 20 分から 24 時間、望ましくは約 30 分から 3 時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたは  $\gamma$ -カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント ( $B_0$ ) から非特異的結合量 (NSB) を引いたカウント ( $B_0 - \text{NSB}$ ) を 100% とした時、特異的結合量 ( $B - \text{NSB}$ ) が、例えば、50% 以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

リガンドと本発明の蛋白質等との結合性を変化させる化合物スクリーニングする前記の④～⑤の方法を実施するためには、例えば、蛋白質を介する細胞刺激活性 (例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下などを促進する活性または抑制する活性など) を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。

具体的には、まず、本発明の蛋白質等を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質 (例えば、アラキドン酸など) の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP 産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当な蛋白質を発現

した細胞が必要である。本発明の蛋白質等を発現した細胞としては、天然型の本発明の蛋白質等を有する細胞株、前述の組換え型蛋白質等を発現した細胞株などが望ましい。

- 試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、  
5 合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが用いられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

- リガンドと本発明の蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、本発明の蛋白質等、本発明の蛋白質等を含有する  
10 細胞、または本発明の蛋白質等を含有する細胞の膜画分を含有するものなどである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

#### 1. スクリーニング用試薬

##### ①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

- 15 Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。

孔径0.45  $\mu\text{m}$ のフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

##### ②G蛋白質共役型レセプター標品

- 20 本発明の蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに $5 \times 10^5$ 個/穴で継代し、37℃、5%  $\text{CO}_2$ 、95% airで2日間培養したもの。

##### ③標識リガンド

- 市販の [ $^3\text{H}$ ]、[ $^{125}\text{I}$ ]、[ $^{14}\text{C}$ ]、[ $^{35}\text{S}$ ]などで標識したリガンド 水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液に  
25 て1  $\mu\text{M}$ に希釈する。

##### ④リガンド標準液

リガンドを0.1%ウシ血清アルブミン (シグマ社製) を含むPBSで1mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。

## 2. 測定法

① 12穴組織培養用プレートにて培養した本発明の蛋白質発現CHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490 $\mu$ lの測定用緩衝液を各穴に加える。

5 ②  $10^{-3} \sim 10^{-10}$  Mの試験化合物溶液を5 $\mu$ l加えた後、標識リガンドを5 $\mu$ l加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物の代わりに $10^{-3}$  Mのリガンドを5 $\mu$ l加えておく。

③ 反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識リガンドを0.2N NaOH-1% SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA（和光純薬製）と混合する。

④ 液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB) を次の式で求める。

$$\text{PMB} = [(B - \text{NSB}) / (B_0 - \text{NSB})] \times 100$$

15 PMB : Percent Maximum Binding

B : 検体を加えた時の値

NSB : Non-specific Binding (非特異的結合量)

$B_0$  : 最大結合量

20 本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、リガンドと本発明の蛋白質等との結合性を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、(イ) G蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、  
25 pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を有する化合物（いわゆる、本発明の蛋白質に対するアゴニスト）、(ロ) 該細胞刺激活性を有しない化合物（いわゆる、本発明の蛋白質に対するアンタゴニスト）、(ハ) リ

ガンドと本発明のG蛋白質共役型蛋白質との結合力を増強する化合物、あるいは（二）リガンドと本発明のG蛋白質共役型蛋白質との結合力を減少させる化合物である。

- 該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、  
5 発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

- 本発明の蛋白質等に対するアゴニストは、本発明の蛋白質等に対するリガン  
ドが有する生理活性と同様の作用を有しているので、該リガンド活性に応じて  
安全で低毒性な医薬 [例えば、中枢疾患(例えばアルツハイマー病・痴呆・摂食  
10 障害(拒食症)・てんかんなど)、ホルモン系の疾患(例えば、微弱陣痛、弛緩  
出血、胎盤娩出前後、子宮復古不全、帝王切開術、人工妊娠中絶、乳汁うっ滞  
など)、肝/胆/膵/内分泌疾患(例えば糖尿病・摂食障害など)、炎症性疾患(アレ  
ルギー・喘息・リュウマチなど)、循環器疾患(例えば高血圧症・心肥大・狭心症・  
動脈硬化等)の予防および/または治療剤など]として有用である。

- 15 本発明の蛋白質等に対するアンタゴニストは、本発明の蛋白質等に対するリ  
ガンドが有する生理活性を抑制することができるので、該リガンド活性を抑制  
する安全で低毒性な医薬[例えば、ホルモン分泌調節薬、本発明の蛋白質等に対  
するリガンドの過剰な産生によって惹起される中枢疾患、ホルモン系の疾患、  
肝/胆/膵/内分泌疾患(例えば抗肥満薬・摂食過剰など)、炎症性疾患、循  
20 環器疾患の予防および/または治療薬など]として有用である。

- リガンドと本発明の蛋白質との結合力を減少させる化合物は、本発明の蛋白  
質等に対するリガンドが有する生理活性を減少させるための安全で低毒性な医  
薬[例えば、ホルモン分泌調節薬、本発明の蛋白質等に対するリガンドの過剰な  
産生によって惹起される中枢疾患、ホルモン系の疾患、肝/胆/膵/内分泌疾  
25 患(例えば抗肥満薬・摂食過剰など)、炎症性疾患、循環器疾患の予防および  
/または治療薬など]として有用である。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られ  
る化合物またはその塩を上述の医薬組成物として使用する場合、常套手段に従

って実施することができる。例えば、前記した本発明の蛋白質を含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとしてすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（60 kgとして）においては、一日につき約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常成人（60 kgとして）においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当りに換算した量を投与することができる。

#### （6）本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩の定量

本発明の抗体は、本発明の蛋白質等を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明の蛋白質等の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。すなわち、本発明は、例えば、（i）本発明の抗体と、被検液および標識化蛋白質等とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化蛋白質等の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明の蛋白質等の定量法、

（ii）被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明の蛋白質等の定量法を提供する。

上記（ii）においては、一方の抗体が本発明の蛋白質等のN端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明の蛋白質等のC端部に反応する抗体であることが好ましい。

本発明の蛋白質等に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明の蛋白質等の測定を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子の $F(a b')_2$ 、 $F a b'$ 、あるいは $F a b$ 画分を用いてもよい。本発明の蛋白質等に対する抗体を用いる測定法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、蛋白質量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、

5   ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、

15   例えば、 $[^{125}I]$ 、 $[^{131}I]$ 、 $[^3H]$ 、 $[^{14}C]$ などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質

20   としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常、蛋白質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる

25   方法でもよい。担体としては、例えば、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が用いられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液



を反応させ（１次反応）、さらに標識化した本発明のモノクローナル抗体を反応させ（２次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明の蛋白質量を定量することができる。１次反応と２次反応は逆の順序に行なっても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行な  
5 ってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。

また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも１種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で２種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

10 本発明のサンドイッチ法による本発明の蛋白質等の測定法においては、１次反応と２次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は本発明の蛋白質等の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。即ち、１次反応および２次反応に用いられる抗体は、例えば、２次反応で用いられる抗体が、本発明の蛋白質のＣ端部を認識する場合、１次反応で用いられる抗体は、好ましくは  
15 Ｃ端部以外、例えばＮ端部を認識する抗体が用いられる。

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原と（Ｆ）と抗体と結合した標識抗原（Ｂ）とを分離  
20 し（Ｂ／Ｆ分離）、Ｂ、Ｆいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、Ｂ／Ｆ分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第２抗体などを用いる液相法、および、第１抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第１抗体は可溶性のものを用い第２抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

25 イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの

相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果、生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメ  
5 トリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明の蛋白質またはその塩の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、  
10 総説、成書などを参照することができる〔例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「メソッズ・イン・エンジモロジー(Methods in  
15 ENZYMOLOGY)」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part  
20 E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)など参照〕。

以上のように、本発明の抗体を用いることによって、本発明の蛋白質またはその塩を感度良く定量することができる。さらに、本発明の抗体を用いて本発  
25 明の蛋白質またはその塩を定量することによって、各種疾病の診断をすることができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明の蛋白質等を検出するために使用することができる。また、本発明の蛋白質等を精製

するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明の蛋白質等の検出、被検細胞内における本発明の蛋白質の挙動の分析などのために使用することができる。

5 (7) 本発明のG蛋白質共役型蛋白質をコードするDNAを有する非ヒト動物の作製

本発明のDNAを用いて、本発明の蛋白質等を発現するトランスジェニック非ヒト動物を作製することができる。非ヒト動物としては、哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）など（以下、動物と略記する）が挙げれるが、特に、マウス、ウサギなどが好適である。

本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させるプロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、ウサギ由来の本発明のDNAを転移させる場合、これと相同性が高い動物由来の本発明のDNAを動物細胞で発現させる各種プロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトを、例えば、ウサギ受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明の蛋白質等を高産生するDNA転移動物を作出できる。このプロモーターとしては、例えば、ウイルス由来プロモーター、メタロチオネイン等のユビキアスな発現プロモーターも使用しうるが、好ましくは脳で特異的に発現するNGF遺伝子プロモーターやエノラーゼ遺伝子プロモーターなどが用いられる。

受精卵細胞段階における本発明のDNAの転移は、対象動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の蛋白質等が存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞及び体細胞の全てに本発明の蛋白質等を有することを意味する。遺伝子を受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の蛋白質等を有する。

本発明のDNA転移動物は、交配により遺伝子を安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で飼育継代を行うことができる。

さらに、目的DNAを保有する雌雄の動物を交配することにより、導入遺伝子を相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

- 5      本発明のDNAが転移された動物は、本発明の蛋白質等が高発現させられているので、本発明の蛋白質等に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング用の動物などとして有用である。

- 10      本発明のDNA転移動物を、組織培養のための細胞源として使用することもできる。例えば、本発明のDNA転移マウスの組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、あるいは遺伝子により発現された本発明の蛋白質が存在する組織を分析することにより、本発明の蛋白質等について分析することができる。本発明の蛋白質等を有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、例えば、脳や末梢組織由来のような一般に培養困難な組織からの細胞の機能を研究することができる。また、その細胞を用いることにより、例えば、各種組織の機能を高めるような医薬の選択も可能である。また、高発現細胞株があれば、そこから、本発明の蛋白質等を単離精製することも可能である。

- 20      本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

- |           |               |
|-----------|---------------|
| DNA       | : デオキシリボ核酸    |
| cDNA      | : 相補的デオキシリボ核酸 |
| 25      A | : アデニン        |
| T         | : チミン         |
| G         | : グアニン        |
| C         | : シトシン        |

	R N A	: リボ核酸
	m R N A	: メッセンジャーリボ核酸
	d A T P	: デオキシアデノシン三リン酸
	d T T P	: デオキシチミジン三リン酸
5	d G T P	: デオキシグアノシン三リン酸
	d C T P	: デオキシシチジン三リン酸
	A T P	: アデノシン三リン酸
	E D T A	: エチレンジアミン四酢酸
	S D S	: ドデシル硫酸ナトリウム
10	G l y	: グリシン
	A l a	: アラニン
	V a l	: バリン
	L e u	: ロイシン
	I l e	: イソロイシン
15	S e r	: セリン
	T h r	: スレオニン
	C y s	: システイン
	M e t	: メチオニン
	G l u	: グルタミン酸
20	A s p	: アスパラギン酸
	L y s	: リジン
	A r g	: アルギニン
	H i s	: ヒスチジン
	P h e	: フェニルアラニン
25	T y r	: チロシン
	T r p	: トリプトファン
	P r o	: プロリン
	A s n	: アスパラギン

	G l n	: グルタミン
	p G l u	: ピログルタミン酸
	T o s	: p-トルエンスルフォニル
	C H O	: ホルミル
5	B z l	: ベンジル
	C l <sub>2</sub> Bz l	: 2, 6-ジクロロベンジル
	B o m	: ベンジルオキシメチル
	Z	: ベンジルオキシカルボニル
	C l - Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル
10	B r - Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
	B o c	: t-ブトキシカルボニル
	D N P	: ジニトロフェノール
	T r t	: トリチル
	B u m	: t-ブトキシメチル
15	F m o c	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
	H O B t	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
	H O O B t	: 3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシー-4-オキソ- 1, 2, 3-ベンゾトリアジン
	H O N B	: 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシイミド
20	D C C	: N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕

本発明のヒト脳由来蛋白質のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：2〕

25 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のヒト脳由来蛋白質をコードするDNAの塩基配列を示す（A Q 2 7）。

〔配列番号：3〕

後述の実施例1および実施例2で用いられたプライマー1の塩基配列を示す。

〔配列番号：4〕

後述の実施例1および実施例2で用いられたプライマー2の塩基配列を示す。

〔配列番号：5〕

後述の実施例2で用いられたフォワードプライマーの塩基配列を示す。

5 〔配列番号：6〕

後述の実施例2で用いられたリバースプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：7〕

後述の実施例2で用いられたプローブの塩基配列を示す。

後述の実施例1で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (Escherichia coli) DH5 $\alpha$ /p cDNA3.1-AQ27は、平成11年8月23日から日本国茨城県つくば市東1丁目1-3の通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH) に寄託番号FERM BP-6854として、平成11年8月4日から日本国大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17-85の財団法人・発酵研究所 (IFO) に寄託番号IFO 16304として寄託されている。

以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作法は、モレキュラー・クローニング (Molecular cloning) に記載されている方法に従った。

20 実施例1 G蛋白質共役型レセプター蛋白質AQ27をコードするcDNAのクローニングと塩基配列の決定

ヒト胎児脳cDNA (CLONTECH社) を鋳型とし、2個のプライマー、プライマー1 (5'-TGT CAG CAT GCA GGC GCT TAA CAT TAC CCC GGA GCA G -3'; 配列番号：3) 及びプライマー2 (5'-GAC TAG TTT AAT GCC CAC  
25 TGT CTA AAG GAG AAT TCT C -3'; 配列番号：4) を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は上記cDNAの10分の1量を鋳型として使用し、Advantage2 Polymerase Mix (CLONTECH社) 1/50量、プライマー1及びプライマー2を各0.2 $\mu$ M、dNTPs 200 $\mu$ M、及び酵素に添付

- のバッファーを加え、25  $\mu$ lの液量とした。PCR反応は、95℃・1分の後、95℃・30秒、72℃・4分のサイクルを5回、95℃・30秒、70℃・4分のサイクルを5回、95℃・30秒、68℃・30秒、66℃・4分のサイクルを30回繰り返し、最後に68℃・3分の伸長反応を行った。該PCR
- 5 反応後の反応産物をTAクローニングキット（Invitrogen社）の処方に従いプラスミドベクターpcDNA3.1/V5/His（Invitrogen社）へサブクローニングし、得られたプラスミドをpcDNA3.1-AQ27と命名した。これを大腸菌DH5  $\alpha$ に導入し、cDNAをもつクローンをアンピシリンを含むLB寒天培地中で選択した後、個々のクローンの配列を解析した結果、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白
- 10 質をコードするcDNA配列を得た。このcDNAより導き出されるアミノ酸配列を有する蛋白質をAQ27と命名し、この形質転換体は大腸菌（*Escherichia coli*）DH5  $\alpha$ /pcDNA3.1-AQ27と命名した。

## 実施例2 TaqMan PCRを用いたAQ27の発現組織分布の解析

- 15 まずプライマー及びプローブはPrimer Express ver. 1.0（PEバイオシステムズジャパン）を用いてデザインし、フォワードプライマー AQ27taqF（5'-CAATG CTAGG TGTGG TCTGG CT-3'（配列番号：5））、リバースプライマー AQ27taqR（5'-GATCT CAAGT TGTTG CACGT GC-3'（配列番号：6））、
- 20 プローブAQ27-515T（5'-TGGCA GTCAT CGTAG GATCA CCCAT G-3'（配列番号：7））を作製した。プローブのリポーター色素はFAM（6-carboxyfluorescein）を付加した。

- スタンダード cDNA は、pcDNA3.1-AQ27を鋳型にしてプライマー 1（配列番号：3）、プライマー 2（配列番号：4）を用いて増幅したPCR断片をQIAquick PCR Purification Kit [QIAGEN（Germany）]にて精製し、10<sup>0</sup> - 10<sup>6</sup> コ
- 25 ピー /  $\mu$ l に調製して用いた。

各組織のcDNAソースはHuman Tissue cDNA Panel I 及び Panel II [CLONTECH Laboratories, Inc.（CA, USA）]を用いた。

TaqMan PCRの反応はTaqMan Universal PCR Master Mix（PEバイオシステ



ムズジャパン) の試薬を用い、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (PE バイオシステムズジャパン) にて、添付の説明書に従い反応させた。

結果を図4および表1に示した。AQ27 は心臓、肝臓、精巣に高い発現が見られた。

5 表 1

Tissue	Expression (copies/ $\mu$ l)
brain	39
heart	158
kidney	74
liver	0
lung	1
pancreas	2
placenta	2
skeletal muscle	4
colon	17
ovary	2
leukocyte	25
prostate	32
small intestine	16
spleen	2
testis	50
thymus	6

### 実施例3 AQ27のMet-Enkephalin-Arg-Phe amideに対する反応

AQ27発現CHO細胞およびmock細胞をサイトセンサー用のカプセルにそれぞれ  $2.7 \times 10^5$  cells/capsule で播種し、一晚培養した後、サイトセンサー (モレキュ  
 10 ラーデバイス社) にセットした。Acidification rateが安定した後、Met-Enkephalin-Arg-Phe amide (Bachem社、H-2835) を  $10 \mu$ M の濃度で7分2秒間作用させ、Acidification rateの上昇率を指標に細胞の活性化を測定した。その結果、Met-Enkephalin-Arg-Phe amideはAQ27発現CHO細胞を特異的に活性化し、AQ27に対して特異的に反応することが確認された (図5)。

15

産業上の利用可能性

本発明の蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、およびそれらをコードするDNAは、①リガンド（アゴニスト）の決定、②抗体および抗血清の入手、③組み替え型蛋白質の発現系の構築、④同発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、⑤構造的に類似した  
5 リガンド・レセプターとの比較にもとづいたドラッグデザインの実施、⑥遺伝子診断におけるプローブやPCRプライマーの作成のための試薬、⑦トランスジェニック動物の作製または⑧遺伝子予防・治療剤等の医薬等として用いることができる。

## 請求の範囲

1. 配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする蛋白質またはその塩。
- 5 2. 請求項1記載の蛋白質の部分ペプチドまたはその塩。
3. 請求項1記載の蛋白質をコードするDNAを含有するDNA。
4. 配列番号：2 で表される塩基配列を有する請求項3記載のDNA。
5. 請求項3記載のDNAを含有する組換えベクター。
6. 請求項5記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。
- 10 7. 請求項6記載の形質転換体を培養し、請求項1記載の蛋白質を生成・蓄積せしめることを特徴とする請求項1記載の蛋白質またはその塩の製造法。
8. 請求項1記載の蛋白質もしくは請求項2記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。
9. 請求項1記載の蛋白質もしくは請求項2記載の部分ペプチドまたはその塩
- 15 を用いることを特徴とする請求項1記載の蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法。
10. 請求項1記載の蛋白質もしくは請求項2記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とするリガンドと請求項1記載の蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。
- 20 11. 請求項1記載の蛋白質もしくは請求項2記載の部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とするリガンドと請求項1記載の蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット。
12. 請求項10記載のスクリーニング方法または請求項11記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リガンドと請求項1記載の蛋白質または
- 25 その塩との結合性を变化させる化合物またはその塩。
13. 請求項10記載のスクリーニング方法または請求項11記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リガンドと請求項1記載の蛋白質またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬。

14. 請求項3記載のDNAとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。





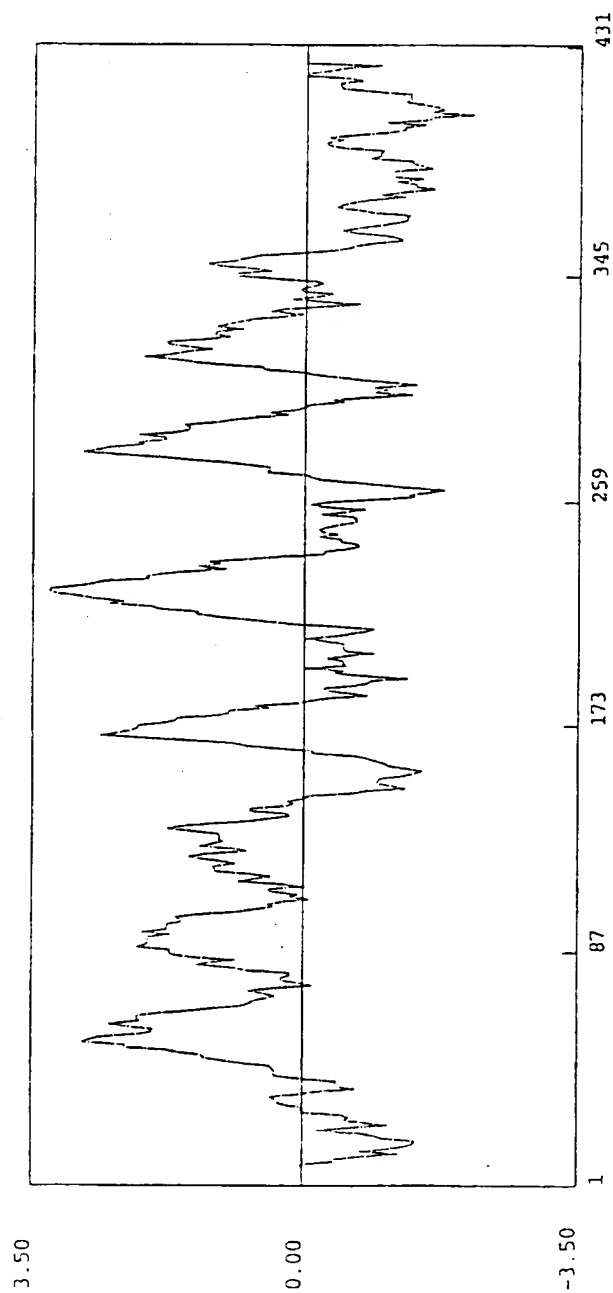
1570 1580 1590 1600 1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680  
AGACAGAGGAGAAGAAAGCTCAAAACGACATCTTGCTCTCTTTAGGTCTGAACTGGCTCAGAAATTCCTCTTTAGACAGCTGGGCATTAATTATAACAATATCTTTCATTAATTAAATGCCCTT  
T E E K K K L K R H L A L F R S E L A E N S P L D S G H .  
1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800  
CAGATTGTAAACCCAAAGAGAAATTAATTGAGCAAGGTCAATACTCTTTTAATTCCTTAAGATGATGACAAAGAAACAAATCATGTTCCTATTAATAAAATGACACGAGGCTAGTC  
1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900 1910 1920  
CAAGTCAGTGAATGTTTACAAACCAATNGATCACAATCAATTAACANAATTTCTGTGTTCTTCATATCCCACTGCTTCACCTTGACTAGCCTTAAATAAAGCAACATGGAAGGCCAGGCACG  
1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000 2010 2020 2030 2040  
GTGGCTCAATGCCCTGTAAATCCCAAGCACTTTGGGAGGCTTAGACGGCGGATCAACGAGTCAGAGATCAAAACCAATCCTCGCTAACACGGTGAAACCCCATCTCTCTCTAAATATACAAAA  
2050 2060 2070 2080 2090 2100 2110 2120 2130 2140 2150 2160  
TTAGCCGGCGCTGGTGGCGGGCACCTGTAGTCCAGCTACTTGGGAGCCTCAGCGCGGAGAAATGGTGATGAAACCCGGAGCGGAGCTTGCAGTGATCCGAGATCATGCCACTGCACCTCCA  
2170 2180 2190 2200 2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280  
GCCTGGCGGAAAGACGGAGACTCCCGCTCTCAAAAAAATTTTTTGAAAAATTCGTAAACCATACTTTTAAGATTATTTTCAGTGGATTTTTTAAAAATCTTGTACAGAAATCAGGGTTCT  
2290 2300 2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400  
TAAGCTAGCAGTTTTTCTCCACCGCAGTCACGTGAATGTGACTATGTAATTGCTAGATGGAATAGAAAAATAAATAATATCTTCTCTCTGNAAAAAAATAAAAAAATAAAAAA  
2410 2420  
AAAAAAAAAAAAAAGG





3/5

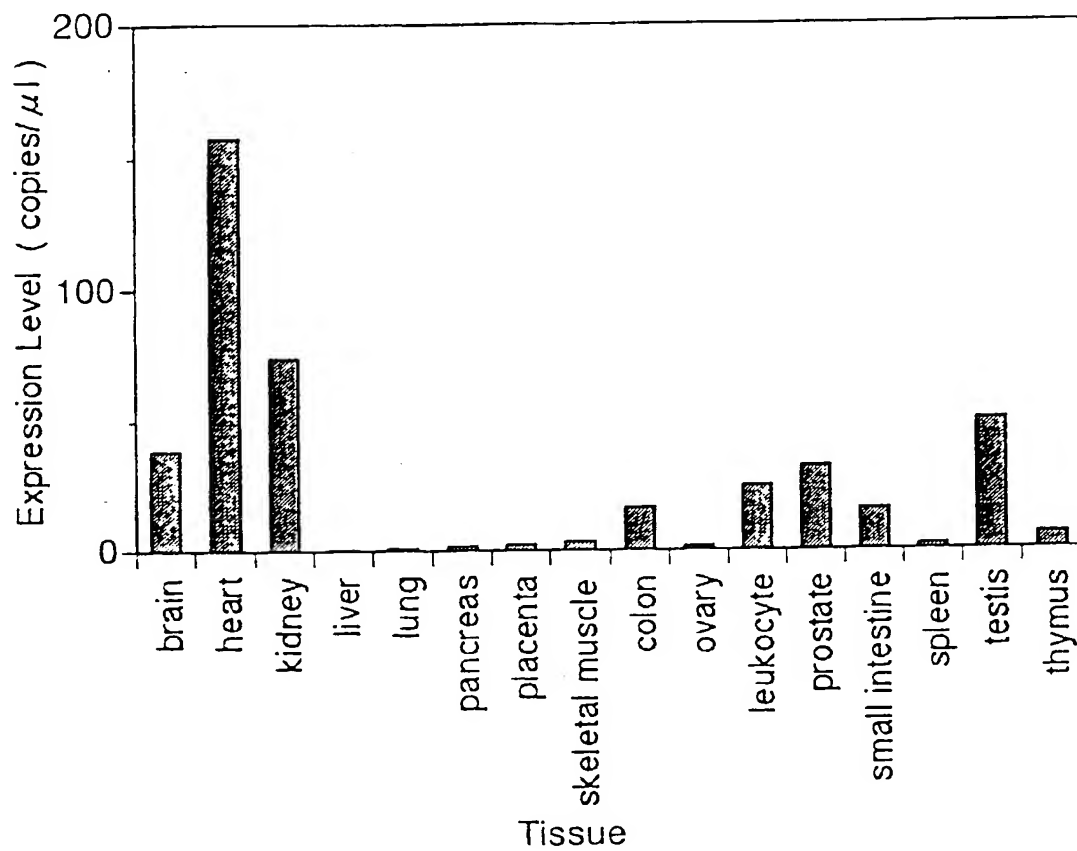
☒ 3





4/5

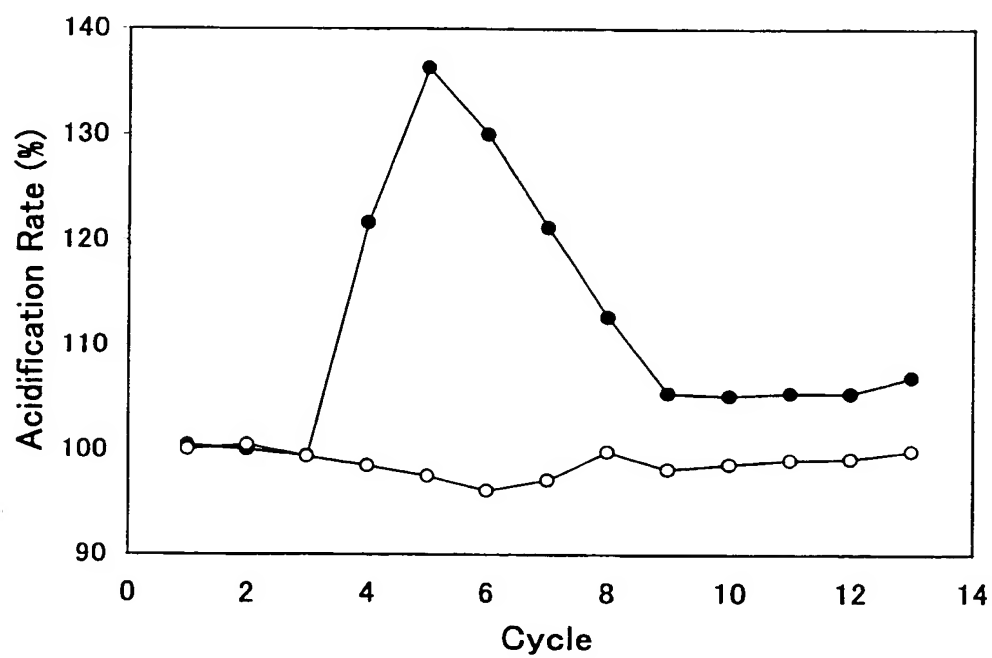
⊗ 4





5/5

☒ 5





## SEQUENCE LISTINGS

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Novel G Protein Coupled Receptor Protein and Its Use

<130> 2633W00P

<150> JP 11-241530

<151> 1999-08-27

<160> 7

<210> 1

<211> 431

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

Met Gln Ala Leu Asn Ile Thr Pro Glu Gln Phe Ser Arg Leu Leu Arg  
1 5 10 15  
Asp His Asn Leu Thr Arg Glu Gln Phe Ile Ala Leu Tyr Arg Leu Arg  
20 25 30  
Pro Leu Val Tyr Thr Pro Glu Leu Pro Gly Arg Ala Lys Leu Ala Leu  
35 40 45  
Val Leu Thr Gly Val Leu Ile Phe Ala Leu Ala Leu Phe Gly Asn Ala  
50 55 60  
Leu Val Phe Tyr Val Val Thr Arg Ser Lys Ala Met Arg Thr Val Thr  
65 70 75 80  
Asn Ile Phe Ile Cys Ser Leu Ala Leu Ser Asp Leu Leu Ile Thr Phe  
85 90 95  
Phe Cys Ile Pro Val Thr Met Leu Gln Asn Ile Ser Asp Asn Trp Leu  
100 105 110  
Gly Gly Ala Phe Ile Cys Lys Met Val Pro Phe Val Gln Ser Thr Ala





2/5

115	120	125	
Val Val Thr Glu Ile Leu Thr Met Thr Cys Ile Ala Val Glu Arg His			
130	135	140	
Gln Gly Leu Val His Pro Phe Lys Met Lys Trp Gln Tyr Thr Asn Arg			
145	150	155	160
Arg Ala Phe Thr Met Leu Gly Val Val Trp Leu Val Ala Val Ile Val			
165	170	175	
Gly Ser Pro Met Trp His Val Gln Gln Leu Glu Ile Lys Tyr Asp Phe			
180	185	190	
Leu Tyr Glu Lys Glu His Ile Cys Cys Leu Glu Glu Trp Thr Ser Pro			
195	200	205	
Val His Gln Lys Ile Tyr Thr Thr Phe Ile Leu Val Ile Leu Phe Leu			
210	215	220	
Leu Pro Leu Met Val Met Leu Ile Leu Tyr Ser Lys Ile Gly Tyr Glu			
225	230	235	240
Leu Trp Ile Lys Lys Arg Val Gly Asp Gly Ser Val Leu Arg Thr Ile			
245	250	255	
His Gly Lys Glu Met Ser Lys Ile Ala Arg Lys Lys Lys Arg Ala Val			
260	265	270	
Ile Met Met Val Thr Val Val Ala Leu Phe Ala Val Cys Trp Ala Pro			
275	280	285	
Phe His Val Val His Met Met Ile Glu Tyr Ser Asn Phe Glu Lys Glu			
290	295	300	
Tyr Asp Asp Val Thr Ile Lys Met Ile Phe Ala Ile Val Gln Ile Ile			
305	310	315	320
Gly Phe Ser Asn Ser Ile Cys Asn Pro Ile Val Tyr Ala Phe Met Asn			
325	330	335	
Glu Asn Phe Lys Lys Asn Val Leu Ser Ala Val Cys Tyr Cys Ile Val			



3/5

340	345	350
Asn Lys Thr Phe Ser Pro Ala Gln Arg His Gly Asn Ser Gly Ile Thr		
355	360	365
Met Met Arg Lys Lys Ala Lys Phe Ser Leu Arg Glu Asn Pro Val Glu		
370	375	380
Glu Thr Lys Gly Glu Ala Phe Ser Asp Gly Asn Ile Glu Val Lys Leu		
385	390	395
Cys Glu Gln Thr Glu Glu Lys Lys Lys Leu Lys Arg His Leu Ala Leu		
405	410	415
Phe Arg Ser Glu Leu Ala Glu Asn Ser Pro Leu Asp Ser Gly His		
420	425	430

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 1293

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 2

ATGCAGGCGC TTAACATTAC CCCGGAGCAG TTCTCTCGGC TGCTGCGGGA CCACAACCTG	60
ACGCGGGAGC AGTTCATCGC TCTGTACCGG CTGCGACCGC TCGTCTACAC CCCAGAGCTG	120
CCGGGACGCG CCAAGCTGGC CCTCGTGCTC ACCGGCGTGC TCATCTTCGC CCTGGCGCTC	180
TTTGGCAATG CTCTGGTGTT CTACGTGGTG ACCCGCAGCA AGGCCATGCG CACCGTCACC	240
AACATCTTTA TCTGCTCCTT GCGCTCAGT GACCTGCTCA TCACCTTCTT CTGCATTCCC	300
GTCACCATGC TCCAGAACAT TTCCGACAAC TGGCTGGGGG GTGCTTTCAT TTGCAAGATG	360
GTGCCATTTG TCCAGTCTAC CGCTGTTGTG ACAGAAATCC TCACTATGAC CTGCATTGCT	420
GTGGAAAGGC ACCAGGGACT TGTGCATCCT TTAAAAATGA AGTGGCAATA CACCAACCGA	480
AGGGCTTTCA CAATGCTAGG TGTGGTCTGG CTGGTGGCAG TCATCGTAGG ATCACCCATG	540
TGGCACGTGC AACAACTGA GATCAAATAT GACTTCCTAT ATGAAAAGGA ACACATCTGC	600
TGCTTAGAAG AGTGGACCAG CCCTGTGCAC CAGAAGATCT ACACCACCTT CATCCTTGTC	660
ATCCTCTTCC TCCTGCCTCT TATGGTGATG CTTATTCTGT ACAGTAAAAT TGGTTATGAA	720



4/5

CTTTGGATAA AGAAAAGAGT TGGGGATGGT TCAGTGCTTC GAACTATTCA TGGAAAAGAA 780  
ATGTCCAAAA TAGCCAGGAA GAAGAAACGA GCTGTCATTA TGATGGTGAC AGTGGTGGCT 840  
CTCTTTGCTG TGTGCTGGGC ACCATTCCAT GTTGTCCATA TGATGATTGA ATACAGTAAT 900  
TTTGAAAAGG AATATGATGA TGTCACAATC AAGATGATTT TTGCTATCGT GCAAATTATT 960  
GGATTTTCCA ACTCCATCTG TAATCCCATT GTCTATGCAT TTATGAATGA AAACCTTCAA 1020  
AAAAATGTTT TGTCTGCAGT TTGTTATTGC ATAGTAAATA AAACCTTCTC TCCAGCACAA 1080  
AGGCATGGAA ATTCAGGAAT TACAATGATG CGGAAGAAAG CAAAGTTTTC CCTCAGAGAG 1140  
AATCCAGTGG AGGAAACCAA AGGAGAAGCA TTCAGTGATG GCAACATTGA AGTCAAATTG 1200  
TGTGAACAGA CAGAGGAGAA GAAAAAGCTC AAACGACATC TTGCTCTCTT TAGGTCTGAA 1260  
CTGGCTGAGA ATTCTCCTTT AGACAGTGGG CAT 1293

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 37

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 3

TGTCAGCATG CAGGCGCTTA ACATTACCCC GGAGCAG 37

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 37

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 4

GACTAGTTTA ATGCCCCACTG TCTAAAGGAG AATTCTC 37

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 22



5/5

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 5

CAATGCTAGG TGTGGTCTGG CT 22

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 6

GATCTCAAGT TGTTCACGT GC 22

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 7

TGGCAGTCAT CGTAGGATCA CCCATG 26





## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05684

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C12N15/09, C07K14/705, C07K16/28,  
C12P21/02, A61K45/00, A61P43/00, G01N33/566,  
G01N33/15, G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C12N15/09, C07K14/705, C07K16/28,  
C12P21/02, A61K45/00, A61P43/00, G01N33/566,  
G01N33/15, G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO, 00/11015, A1 (ALPHAGENE, INC), 02 March, 2000 (02.03.00) & AU, 9957847, A	1-14
P, X	WO, 00/22131, A2 (BEHAN, Dominic, P. et al.), 20 April, 2000 (20.04.00) & AU, 9962991, A	1-14
Y	LIBERT, F. et al., "Selective amplification and cloning of four new members of the G protein-coupled receptor family", Science (1989), Vol. 244, No. 4904, pp.569-572	1-14
Y	NOTHACKER, H. P. et al., "Molecular cloning of a novel, putative G protein-coupled receptor from sea anemones structurally related to members of the FSH, TSH, LH/CG receptor family from mammals", BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. (1993) Vol.197, No.3, pp.1062-1069	1-14
Y	EP, 877083, A (SMITHKLINE BEECHAM CORP.), 11 November, 1998 (11.11.98) & JP, 11-75870, A	1-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 12 December, 2000 (12.12.00)	Date of mailing of the international search report 19 December, 2000 (19.12.00)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05684

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO, 97/24436, A2 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.), 10 July, 1997 (10.07.97) & AU, 1208497, A & JP, 10-146192, A & EP, 870020, A & CN, 1207126, A	1-14

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C12N15/09, C07K14/705, C07K16/28,  
C12P21/02, A61K45/00, A61P43/00, G01N33/566,  
G01N33/15, G01N33/50

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C12N15/09, C07K14/705, C07K16/28,  
C12P21/02, A61K45/00, A61P43/00, G01N33/566,  
G01N33/15, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	WO, 00/11015, A1 (ALPHAGENE, INC) 2. 3月. 2000 (02. 03. 00) &AU, 9957847, A	1 - 14
P, X	WO, 00/22131, A2 (BEHAN, Dominic, P. et al) 20. 4月. 2000 (20. 04. 00) &AU, 9962991, A	1 - 14

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12. 12. 00

国際調査報告の発送日

19. 12. 00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

六笠 紀子

印

4 B

9 7 3 5

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	LIBERT, F. et al. "Selective amplification and cloning of four new members of the G protein-coupled receptor family", Science (1989)第244巻, 第4904号, p. 569-572	1-14
Y	NOTHACKER, H. P. et al. "Molecular cloning of a novel, putative G protein-coupled receptor from sea anemones structurally related to members of the FSH, TSH, LH/CG receptor family from mammals", BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. (1993)第197巻, 第3号, p. 1062-1069	1-14
Y	EP, 877083, A (SMITHKLINE BEECHAM CORP.) 11. 11月. 1998 (11. 11. 98) & JP, 11-75870, A	1-14
Y	WO, 97/24436, A2 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) 10. 7月. 1997 (10. 07. 97) & AU, 1208497, A & JP, 10-146192, A & EP, 870020, A & CN, 1207126, A	1-14

## PATENT COOPERATION TREATY

担当者	G.M			部長
印				

PCT

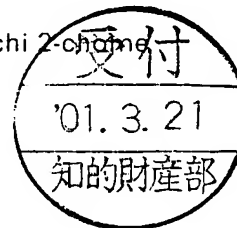
From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE  
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL  
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

To:

TAKAHASHI, Shuichi  
Osaka Plant of Takeda Chemical  
Industries, Ltd.  
17-85, Jusohonmachi 2-chome  
Yodogawa-ku  
Osaka-shi  
Osaka 532-0024  
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 08 March 2001 (08.03.01)		
Applicant's or agent's file reference 2633WOOP		IMPORTANT NOTICE
International application No. PCT/JP00/05684	International filing date (day/month/year) 24 August 2000 (24.08.00)	
Priority date (day/month/year) 27 August 1999 (27.08.99)		
Applicant TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. et al		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:

AU, KR, US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

AE, AG, AL, AM, AP, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, DZ, EA, EE, EP, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KZ, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MX, MZ, NO, NZ, OA, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UZ, VN, YU, ZA

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 08 March 2001 (08.03.01) under No. WO 01/16316

## REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

## REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No. (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer J. Zahra</p> <p>Telephone No. (41-22) 338.83.38</p>
---	---



## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

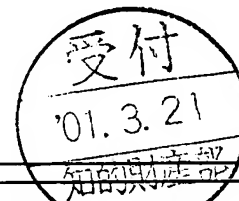
INFORMATION CONCERNING ELECTED  
OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

TAKAHASHI, Shuichi  
Osaka Plant of Takeda Chemical  
Industries, Ltd.  
17-85, Jusohonmachi 2-chome  
Yodogawa-ku  
Osaka-shi  
Osaka 532-0024  
JAPON



Date of mailing (day/month/year)

08 March 2001 (08.03.01)

Applicant's or agent's file reference

2633WO0P

## IMPORTANT INFORMATION

International application No.

PCT/JP00/05684

International filing date (day/month/year)

24 August 2000 (24.08.00)

Priority date (day/month/year)

27 August 1999 (27.08.99)

Applicant

TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. et al

1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:

AP : GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW

EP : AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE

National : AU,BG,CA,CN,CZ,IL,JP,KR,MN,NO,NZ,PL,RO,RU,SK,US

2. The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:

EA : AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM

OA : BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG

National : AE,AG,AL,AM,AZ,BA,BB,BR,BY,BZ,CR,CU,DM,DZ,EE,GD,GE,HR,HU,ID,IN,  
IS,KG,KZ,LC,LK,LR,LT,LV,MA,MD,MG,MK,MX,MZ,SG,SI,TJ,TM,TR,TT,UA,UZ,VN,YU,  
ZA

3. The applicant is reminded that he must enter the "national phase" before the expiration of 30 months from the priority date before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 39(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 36(3)(b) and Rule 74.1).

Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The entry into the European regional phase is postponed until 31 months from the priority date for all States designated for the purposes of obtaining a European patent.

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

J. Zahra

Telephone No. (41-22) 338.83.38





11T  
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 2633WO0P	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/05684	International filing date ( <i>day month year</i> ) 24 August 2000 (24.08.00)	Priority date ( <i>day month year</i> ) 27 August 1999 (27.08.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/12, 15/09, C07K 14/705, 16/28, C12P 21/02, A61K 45/00, A61P 43/00, G01N 33/566, 33/15, 33/50		
Applicant TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>4</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>

Date of submission of the demand 29 September 2000 (29.09.00)	Date of completion of this report 15 May 2001 (15.05.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/05684

## I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

JP 00/05684

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-14	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-14	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-14	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

Document 1: Libert, F. et al., "Selective amplification and cloning of four new members of the G protein-coupled receptor family," Science (1989), Vol. 244, No. 4904, pp. 569-572

Document 2: EP, 877083, A (Smithkline Beecham Corp.), 11 November 1998 (11.11.98), & JP, 11-75870, A

Claims 1 to 14

Document 1 discloses a feature wherein a conserved sequence in a known G protein-coupled receptor protein is used to prepare a primer, the primer is used to clone a novel G protein-coupled receptor protein from a cDNA library, and the DNA sequence and amino acid sequence are determined.

Document 2 discloses the identification of a G protein-coupled receptor protein using human brain as a source.

A person skilled in the art could easily conceive of using a conserved sequence in a known G protein-coupled receptor protein to prepare a primer for identifying a novel G protein-coupled receptor protein, as disclosed in Document 1, in identifying a G protein-coupled receptor



protein from the human brain, as disclosed in Document 2. The specific G protein-coupled receptor protein isolated in the present application does not have any unexpected advantageous effects relative to a novel G protein-coupled receptor protein obtained in the above manner.

In addition, features such as preparation of an antibody to the resulting protein, characterization of a ligand, and screening of compounds capable of altering binding properties of the ligand are merely features fittingly determined by a person skilled in the art.

Therefore, a person skilled in the art could easily conceive of the inventions described in Claims 1 to 14 in the light of the disclosures in Documents 1 and 2.





# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/JP 96/03821

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 6 C12N15/12 C07K14/47 C07K14/705 C07K16/18 C12N1/21 G01N33/50 A61K38/17		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. (04-1995), 209(2), 606-13 CODEN: BBRC9;ISSN: 0006-291X, 1997, XP002032820	20
Y	WELCH, SUSAN K. ET AL: "Sequence and tissue distribution of a candidate G-coupled receptor cloned from rat hypothalamus" see the whole document --- -/--	1-19
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  11 June 1997		Date of mailing of the international search report  17.06.97
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016		Authorized officer  Gurdjian, D



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/JP 96/03821

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>GENOMICS (09-1995), 29(2), 335-44 CODEN: GNMCEP; ISSN: 0888-7543, XP000673922</p> <p>MARCHESE, ADRIANO ET AL: "Cloning and chromosomal mapping of three novel genes, GPR9, GPR10, and GPR14, encoding receptors related to interleukin 8, neuropeptide Y, and somatostatin receptors"</p> <p>see page 337, right-hand column, paragraph 2 - page 338, left-hand column, paragraph 1</p> <p>see page 339, right-hand column, paragraph 2 - page 344, left-hand column, paragraph 1</p>	20
Y	<p>---</p> <p>WO 91 12273 A (ZYMOGENETICS INC) 22 August 1991</p> <p>see claims 9-18</p> <p>---</p>	1-19
P,X	<p>---</p> <p>WO 96 05302 A (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD ;HINUMA SHUJI (JP); HOSOYA MASAKI ()) 22 February 1996</p> <p>see claims 1-18; figures SEQ.24-33</p> <p>-----</p>	1,20



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern al Application No  
PCT/JP 96/03821

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9112273 A	22-08-91	US 5284746 A	08-02-94
		AT 152479 T	15-05-97
		AU 7333691 A	03-09-91
		CA 2074837 A	09-08-91
		CS 9100313 A	12-11-91
		DE 69125953 D	05-06-97
		EP 0594594 A	04-05-94
		IE 63987 B	28-06-95
		JP 5504258 T	08-07-93
		US 5576210 A	19-11-96
WO 9605302 A	22-02-96	AU 4426296 A	07-03-96
		CA 2195768 A	22-02-96
		JP 9000268 A	07-01-97



PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

To:

Commissioner  
US Department of Commerce  
United States Patent and Trademark  
Office, PCT  
2011 South Clark Place Room  
CP2/5C24  
Arlington, VA 22202  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 08 March 2001 (08.03.01)	
International application No.: PCT/JP00/05684	Applicant's or agent's file reference: 2633WOOP
International filing date: 24 August 2000 (24.08.00)	Priority date: 27 August 1999 (27.08.99)
Applicant: WATANABE, Takuya et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:  
29 September 2000 (29.09.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was  
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer:  J. Zahra
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

